

**ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**
**CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF MEDICINAL COMPOUNDS
AND BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-5-26-35>



УДК 547.1

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Синтез и биологическая активность *N*-(α -диэтоксифосфорил-циклопропилкарбонил)аминокислот – структурных аналогов *N*-фосфоацетил-*L*-аспартата

И.С. Кузьмин[@], Д.Ю. Юрьев, Г.А. Топорков, А.В. Калистратова, Л.В. Коваленко

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, 125047 Россия

[@] Автор для переписки, e-mail: kuzka06@mail.ru

Цели. С развитием и совершенствованием новых систем доставки для веществ различного характера, вновь приобретают актуальность фосфорорганические соединения с антиметаболитным механизмом действия. К ним можно отнести, например, фосфорорганические аналоги карбоновых кислот, такие как *N*-фосфоацетил-*L*-аспартат (PALA) и *N* фосфоацетил-*L*-изоаспарагин, являющиеся биорационально разработанными аналогами переходного состояния карбамоиласпартата в реакции биосинтеза пиримидиновых оснований, которая катализируется ферментом аспартат-транскарбамоилазой (ATCase). Несмотря на высокую активность эти соединения не нашли широкого применения из-за большого количества побочных эффектов и низкой биодоступности. С учетом открывающихся возможностей по доставке фосфатных и фосфонатных производных в клетки-мишени, получение более эффективных аналогов PALA кажется интересной и перспективной задачей. Поэтому целью данной работы являлись синтез и исследование биологической активности новых производных фосфонукусной кислоты – *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)-замещенных аминокислот – аналогов *N*-фосфоацетил-*L*-аспартата (PALA).

Методы. Для направленной работы в рамках исследования применяли метод молекулярного докинга, который позволяет смоделировать связывание *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)-замещенных аминокислот с аспартат-транскарбамоилазой. Целевые соединения были синтезированы с использованием классических методов органического синтеза. Исследование цитотоксичности проводили по отношению к клеточным линиям рака молочной железы человека (MDA-MB-231), рака кожи (A-375) и глиобластомы (U-87 MG).

Результаты. В рамках работы был осуществлен синтез восьми новых *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)-замещенных аминокислот. Исследование ряда синтезированных производных на противораковую активность не выявило значимого проявления цитотоксичности.

Выводы. *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)-замещенные аминокислоты представляют собой синтетически доступные аналоги PALA, способные к более сильному взаимодействию с ATCase. Тем не менее синтезированные в данной работе соединения не проявили выраженных противораковых свойств. Одной из причин низкой активности может быть наличие эфирных групп в фосфонатном структурном элементе.

Ключевые слова: фосфонкарбоновые кислоты, *N*-фосфонацетил-*L*-аспартат (PALA), аспартат-транскарбомоилаза (ATCase), диэтоксифосфорилуксусная кислота, α -диэтоксифосфорилциклопропанкарбоновая кислота, *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)-замещенные аминокислоты.

Для цитирования: Кузьмин И.С., Юрьев Д.Ю., Топорков Г.А., Калистратова А.В., Коваленко Л.В. Синтез и биологическая активность *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)аминокислот – структурных аналогов *N*-фосфонацетил-*L*-аспартата. 2020;15(5):26-35. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-5-26-35>

RESEARCH ARTICLE

Synthesis and biological activity of *N*-phosphonacetyl-*L*-aspartate's structural analogs *N*-(α -diethoxyphosphorylcyclopropylcarbonyl)-amino acids

Ivan S. Kuzmin[@], Danil Yu. Yuriev, Grigorii A. Toporkov, Antonida V. Kalistratova, Leonid V. Kovalenko

D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125047 Russia

[@]Corresponding author, e-mail: kyzka06@mail.ru

Objectives. With the development and improvement of new delivery systems for substances of various natures, organophosphorus compounds with an antimetabolic mechanism of action have become relevant again. A few examples of them are organophosphorus analogs of carboxylic acids, such as *N*-phosphonacetyl-*L*-aspartate (PALA) and *N*-phosphonacetyl-*L*-isoasparagine, both of which are bio-rationally developed analogs of the transition state of carbamoylaspartate in the biosynthesis of pyrimidine bases, which is catalyzed by the enzyme aspartate transcarbamoylase (ATCase). Despite their high activity, these compounds have not found widespread use as anticancer agents due to a large number of side-effects and low bioavailability. Given the emerging opportunities for the delivery of phosphate and phosphonate derivatives into target cells, obtaining more effective analogs of PALA seems to be an interesting and promising research objective. The goal of the present study was thus to synthesize and study the biological activities of novel PALA analogs that are derivatives of phosphonacetic acid.

Methods. For directed work within the framework of the study, we used the molecular docking method, which allowed us to simulate the binding of *N*-(α -diethoxyphosphorylcyclopropylcarbonyl)-substituted amino acids to ATCase. The target compounds were synthesized using classical methods of organic synthesis. The obtained compounds' cytotoxicity was probed in relation to cell lines of human breast cancer (MDA-MB-231), skin cancer (A-375), and glioblastoma (U-87 MG).

Results. The synthesis of eight novel *N*-(α -diethoxyphosphorylcyclopropylcarbonyl)-substituted amino acids was carried out. A few of the synthesized derivatives were tested for anticancer activity, but none displayed significant cytotoxicity.

Conclusions. *N*-(α -diethoxyphosphorylcyclopropylcarbonyl)-substituted amino acids are synthetically available analogs of PALA, a compound capable of strong interaction with ATCase. However, the compounds synthesized in this work did not display any pronounced anticancer properties. One of the reasons for the observed low activity may be the presence of ether groups in the phosphonate building block.

Keywords: *phosphonocarboxylic acids, N-phosphonacetyl-L-aspartate (PALA), aspartate transcarbamylase (ATCase), α -diethoxyphosphonacetic acid, α -diethoxyphosphorylcyclopropylcarboxylic acid, N-(α -diethoxyphosphorylcyclopropylcarbonyl)amino acids.*

For citation: Kuzmin I.S., Yuriev D.Yu., Toporkov G.A., Kalistratova A.V., Kovalenko L.V. Synthesis and biological activity of *N*-phosphonacetyl-L-aspartate's structural analogs *N*-(α -diethoxyphosphorylcyclopropylcarbonyl)amino acids. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2020;15(5):26-35 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-5-26-35>

ВВЕДЕНИЕ

Противоопухолевые препараты с антиметаболическим механизмом активности прочно вошли в практику лечения онкологических заболеваний. Они различаются по структуре, внутриклеточному метаболизму, механизму цитотоксического действия, но все они так или иначе являются аналогами естественных метаболитов и могут конкурировать с ними и за транспортные пути в клетку, и за участие в ключевых ферментативных процессах. Для лечения онкологических заболеваний особенно актуальны антиметаболиты биосинтеза нуклеиновых кислот.

Одним из перспективных противоопухолевых препаратов 80-х годов XX века являлся разработанная в результате биорационального подхода *N*-фосфонацетил-L-аспартат (PALA) **1** (рис. 1). Противоопухолевая активность PALA основана на его структурном подобии переходному состоянию карбамоиласпартата, который участвует в реакции биосинтеза пиримидиновых оснований, катализируемой аспартат-транскарбамоилазой (ATCase) [1–4].

PALA проявил высокую активность в отношении солидных опухолей и прошёл две фазы клинических испытаний [5, 6]. К сожалению, как и для многих других фосфорорганических соединений,

высокая активность PALA *in vitro* не воспроизводится *in vivo* из-за низкой биодоступности этого соединения и большого количества возникающих побочных эффектов [7, 8]. Поэтому представляет интерес синтез новых производных фосфонуксусной кислоты с потенциальной противораковой активностью и улучшенными фармакологическими свойствами.

К известным производным фосфонуксусной кислоты, являющимся структурными аналогами PALA, относятся соединения **2–4**, представленные на рис. 2. Эти соединения обладают меньшим суммарным зарядом и улучшенными фармакологическими свойствами, но значительно более низкой активностью по сравнению с PALA [9].

Учитывая структурное подобие PALA интермедиату биосинтеза карбамоиласпартата, мы предположили, что для увеличения биологической активности производных фосфонуксусных кислот ключевое значение имеет оптимальный угол связи P–C, который позволит обеспечить устойчивость конформации, наиболее благоприятной для формирования комплекса с активным центром фермента. Дополнительно учитывалось наличие в структуре молекулы выраженного гидрофобного фрагмента из-за присутствия в структуре ATCase «гидрофобного кармана», что увеличит прочность связывания фермента с

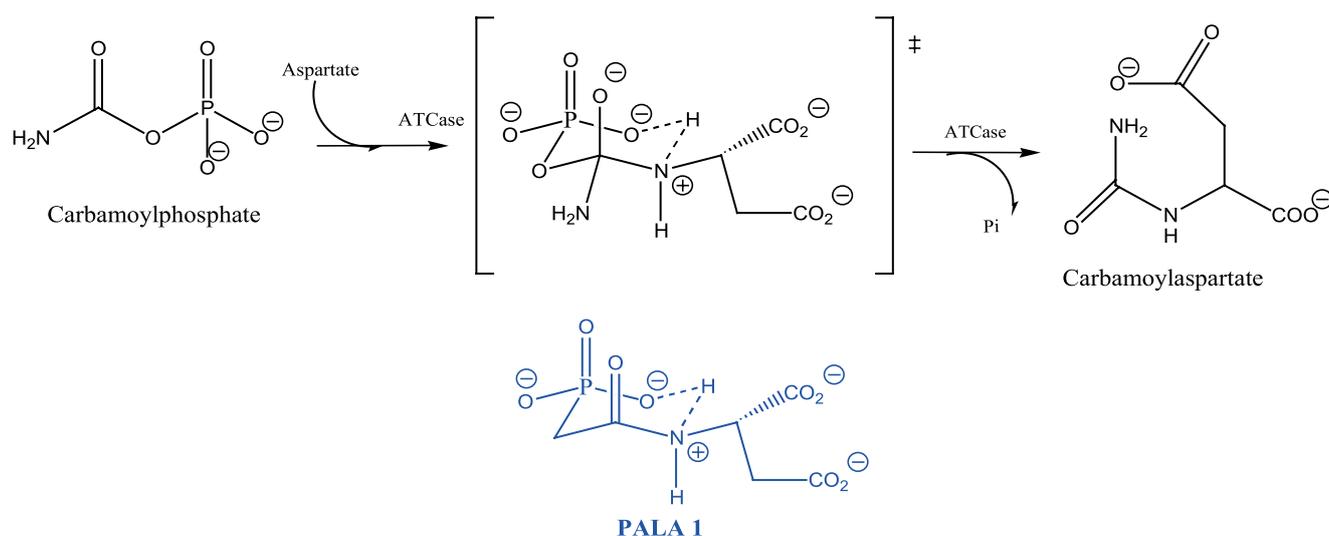


Рис. 1. Структурное подобие PALA интермедиату биосинтеза карбамоиласпартата.

Fig. 1. Structural similarity between *N*-phosphonacetyl-L-aspartate and the intermediate of carbamoylaspartate biosynthesis.

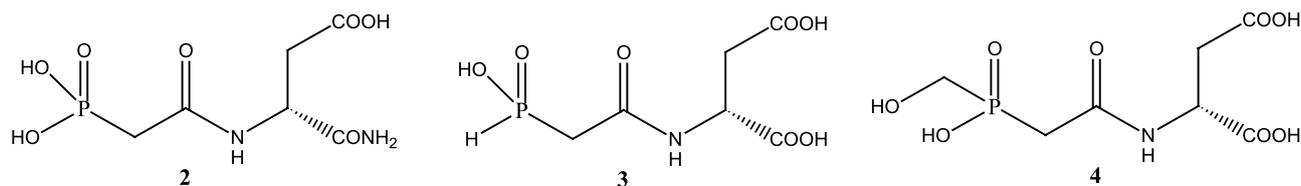


Рис. 2. Структурные формулы аналогов *N*-фосфонацетил-L-аспартата.
Fig. 2. Structural formulas of *N*-phosphonacetil-L-aspartate analogs.

субстратом. Это возможно путем введения объемных заместителей у атома углерода фосфонацетатного скелета. Интересными с точки зрения синтетической доступности, варьирования угла связи P–C и содержания гидрофобного фрагмента являются циклопропан-замещенные фосфонукусные кислоты, синтез и изучение противораковой активности которых и были осуществлены в рамках данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Хромато-масс-спектрометрический анализ осуществляли на приборе Thermo Fisher Scientific Surveyor MSQ (*Thermo Fisher Scientific*, США) с колонкой для высокоэффективной жидкостной хроматографии Phenomenex Onyx Monolithic C18 25 × 4.6 mm (*Phenomenex*, США). В качестве подвижной фазы применялась двухкомпонентная смесь 0.1% раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила (растворитель – 100% диметилсульфоксид (ДМСО), градиентное элюирование, скорость потока – 1.5 мл/мин, температура – 25 °С применяемый тип ионизации при атмосферном давлении, электроспрей). Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ¹H регистрировали на приборе Varian MercuryPlus 400 (*Varian*, США) (CDCl₃, ДМСО-*d*₆, внутренний стандарт – тетраметилсилан). Температуры плавления определяли на приборе Stuart SMP20 (*Stuart*, Великобритания). Для тонкослойной хроматографии использовались алюминиевые пластинки Merck TLC Silica gel 60 F254 (размер 10 × 20 см) (*Merck*, Германия). Для колоночной хроматографии применяли силикагель 60 фирмы Merck с размером частиц от 0.015 мм до 0.040 мм. Для проведения реакций под воздействием СВЧ-облучения использовали микроволновый реактор SEM DU 9369 (*SEM Corporation*, США).

Перед использованием перегоняли ДМСО над гидридом кальция; дибромэтан перегоняли при пониженном давлении; применяемые аминокислоты не подвергали предварительной очистке; триэтиламин перегоняли над КОН; триэтилфосфит не подвергали предварительной очистке; растворители для экстракции применяли без предварительной подготовки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Триэтиловый эфир фосфонукусной кислоты (5).

В пробирке для микроволнового реактора объемом 10 мл, снабженной септой, смешивают 3.32 г (0.02 моль) триэтилфосфита и 2.45 г (0.02 моль) этилового эфира α-хлоруксусной кислоты. Реакцию проводят при микроволновом облучении мощностью 250 Вт и температуре 170 °С в течение 1 ч. Выделение конечного продукта осуществляют вакуумной перегонкой на масляном насосе. Выход 3.85 г (86%). *T*_{кип} = 110 °С (0.1 мм рт. ст.). ¹H ЯМР-спектр (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ (м.д.) 4.07 (dq, *J* = 15.1, 7.1 Гц, 6H), 3.10 (d, *J* = 21.4 Гц, 2H), 1.22 (dt, *J* = 18.4, 7.1 Гц, 9H).

Этиловый эфир α-диэтоксифосфорилциклопропанкарбоновой кислоты (6).

В колбе объемом 500 мл смешивают 15 г (0.067 моль) измельченного КОН и 100 мл свежеперегнанного ДМСО. К полученной суспензии при перемешивании последовательно прибавляют по каплям 7.48 г (0.03 моль) этилового эфира диэтоксифосфонукусной кислоты и 25.19 г (0.268 моль) дибромэтана. Далее к реакционной массе прибавляют 170 мл ДМСО. Полученную суспензию перемешивают при комнатной температуре в течение 72 ч. Для отделения продуктов реакции от ДМСО в реакционную смесь добавляют 200 мл воды и проводят экстракцию эфиром (3 раза по 100 мл), а затем хлороформом (2 раза по 100 мл). Полученные органические фазы сушат над Na₂SO₄, отфильтровывают и объединяют. Растворитель удаляют в вакууме водоструйного насоса. Выделение конечного продукта осуществляют вакуумной перегонкой на масляном насосе. Выход 5.60 г (67%). *T*_{кип} = 110–115 °С (0.1 мм рт. ст.). ¹H ЯМР-спектр (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ (м.д.) 4.16–3.96 (m, 6H), 1.38–1.27 (m, 1H), 1.21 (dt, *J* = 16.0, 7.1 Гц, 1H).

α-Диэтоксифосфорилциклопропанкарбоновая кислота (7).

В плоскодонной колбе объемом 500 мл смешивают 20.573 г (0.08 моль) этилового эфира α-диэтоксифосфорилциклопропанкарбоновой кислоты и 140 мл 1 н. (0.14 моль) водного раствора КОН. Перемешивают в течение 30 мин при комнатной температуре, затем подкисляют реакционную смесь 20% раствором H₂SO₄ до pH 2. Реакционную смесь перемешивают 30 мин при комнатной температуре.

Конечный продукт экстрагируют хлороформом (4 раза по 50 мл). Объединенный органический экстракт сушат над Na_2SO_4 , растворитель удаляют на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса. Продукт перекристаллизовывают из эфира с добавлением гексана. Получают белые гигроскопичные кристаллы с желтоватым оттенком массой 10.7 г (60%). $T_{\text{пл}} = 85\text{--}87^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО): δ (м.д.) 4.16 (dq, $J = 14.2, 7.1$ Гц, 4H), 1.45–1.38 (m, 4H), 1.35 (t, $J = 7.0$ Гц, 6H).

Хлорангидрид α -диэтоксифосфорилциклопропанкарбонной кислоты.

К 5 г (0.023 моль) α -диэтоксифосфорилциклопропанкарбонной кислоты добавляют 7 мл (0.23 моль) SOCl_2 . Реакционную смесь нагревают до 50°C и перемешивают в течение 1 ч до прекращения выделения газа. Избыток SOCl_2 удаляют в вакууме водоструйного насоса. Полученный хлорангидрид используют в реакции ацилирования без предварительной очистки.

Общая методика получения амидов α -диэтоксифосфорилциклопропанкарбонной кислоты 8–11.

В трехгорлую колбу объемом 100 мл, снабженную термометром, капельной воронкой и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, помещают 0.014 моль сухого гидрохлорида этилового или метилового эфира аминокислоты, предварительно измельчив его. Далее при перемешивании добавляют около 30 мл хлороформа и 0.04 моль триэтиламина. Реакционную смесь охлаждают до 0°C в бане со льдом в течение 0.5 ч и, продолжая охлаждать, аккуратно добавляют по каплям 0.014 моль хлорангидрида. Реакционную смесь перемешивают в течение 0.5 ч при комнатной температуре и упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса. К остатку добавляют 100 мл этилацетата, перемешивают в течение 10 мин при комнатной температуре и полученный осадок отфильтровывают. Фильтрат упаривают на роторном испарителе, остаток разделяют колоночной хроматографией (элюент этилацетат). Получают вязкую жидкость ярко-желтого цвета.

Этиловый эфир *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)глицина (8), выход 3.18 г (74%). ^1H ЯМР-спектр (400 МГц, ДМСО- d_6): δ (м.д.) 8.04 (t, $J = 5.5$ Гц, 1H), 4.20–4.04 (m, 6H), 3.94 (d, $J = 5.7$ Гц, 2H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Гц, 9H), 1.26–1.13 (m, 4H).

Масс-спектр (LC–MS), m/z (I , %): эксп. 308.062 $[\text{MH}]^+$, 100%; расчет. 308.29 $[\text{MH}]^+$.

Диметилловый эфир *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)аспарагиновой кислоты (11), выход 3.88 г (76%). ^1H ЯМР-спектр (400 МГц, ДМСО- d_6): δ (м.д.) 8.19 (d, $J = 7.9$ Гц, 1H), 4.74 (dt,

$J = 7.9, 5.5$ Гц, 1H), 4.08 (dq, $J = 11.3, 7.1$ Гц, 4H), 3.64 (d, $J = 14.3$ Гц, 6H), 2.93–2.74 (m, 2H), 1.30–1.22 (m, 6H), 1.22–1.06 (m, 4H).

Масс-спектр (LC–MS), m/z (I , %): эксп. 366.108 $[\text{MH}]^+$, 100%; расчет. 366.13 $[\text{MH}]^+$.

Этиловый эфир *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)метионина (9), выход 3.38 г (77%). ^1H ЯМР-спектр (400 МГц, CDCl_3): δ (м.д.) 8.05 (d, $J = 7.5$ Гц, 1H), 4.67 (td, $J = 7.4, 4.9$ Гц, 1H), 4.17 (m, 4H), 3.74 (s, 3H), 2.58–2.46 (m, 2H), 2.17 (tt, $J = 14.2, 6.3$ Гц, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.06–1.95 (m, 1H), 1.51–1.42 (m, 2H), 1.35 (q, $J = 7.3$ Гц, 6H), 1.31–1.22 (m, 2H).

Масс-спектр (LC–MS), m/z (I , %): эксп. 354.336 $[\text{MH}]^+$, 100%; расчет. 354.38 $[\text{MH}]^+$.

Метилловый эфир *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)- γ -аминомасляной кислоты (10), выход 3.77 г (84%). ^1H ЯМР-спектр (400 МГц, ДМСО- d_6): δ (м.д.) 7.71 (t, $J = 5.5$ Гц, 1H), 4.21–3.98 (m, 4H), 3.62 (s, 3H), 3.16 (q, $J = 6.5$ Гц, 2H), 2.42–2.29 (m, 2H), 1.70 (p, $J = 7.1$ Гц, 2H), 1.28 (t, $J = 7.0$ Гц, 6H), 1.24–1.01 (m, 4H).

Общая методика получения эфиров *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)-аминокислот 12–15.

К 6.51 ммоль соответствующего эфира *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)аминокислоты при перемешивании добавляют 7.9 ммоль 1 М раствора КОН и перемешивают в течение 24 ч при комнатной температуре. Раствор калиевой соли подкисляют 20% HCl до pH 3, продолжая перемешивание в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса, добавляют 50 мл изопропилового спирта и образовавшийся осадок отфильтровывают. Органический фильтрат упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса, остаток охлаждают в морозильной камере до кристаллизации целевого продукта.

***N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)глицин (12)**, выход 1.27 г (70%). $T_{\text{пл}}: 75\text{--}77^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР-спектр (400 МГц, ДМСО- d_6): δ (м.д.) 7.94 (t, $J = 5.5$ Гц, 1H), 4.19–4.01 (m, 4H), 3.83 (d, $J = 5.5$ Гц, 2H), 1.24 (t, $J = 7.0$ Гц, 6H), 1.22–1.00 (m, 4H).

Масс-спектр (LC–MS), m/z (I , %): эксп. 279.97 $[\text{MH}]^+$, 100%; расчет. 280.24 $[\text{MH}]^+$.

***N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)аспарагиновая кислота (15)**, выход 1.18 г (54%). ^1H ЯМР-спектр (400 МГц, ДМСО- d_6): δ (м.д.) 8.32 (s, 1H), 8.13 (d, $J = 7.8$ Гц, 1H), 4.58 (dt, $J = 7.9, 5.0$ Гц, 1H), 4.12–4.02 (m, 4H), 2.82–2.63 (m, 2H), 1.29–1.21 (m, 6H), 1.21–1.13 (m, 4H).

Масс-спектр (LC–MS), m/z (I , %): эксп. 338.111 $[\text{MH}]^+$, 100%; расчет. 338.27 $[\text{MH}]^+$.

N-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)-метионин (**13**), выход 1.56 г (68%). ^1H ЯМР-спектр (400 МГц, CDCl_3): δ (м.д.) 8.00 (d, $J = 7.3$ Гц, 1H), 4.65 (td, $J = 7.2, 5.1$ Гц, 1H), 4.17 (p, $J = 5.7$ Гц, 4H), 2.72–2.48 (m, 2H), 2.30–2.15 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.07–1.95 (m, 1H), 1.56–1.40 (m, 2H), 1.38–1.31 (m, 6H), 1.31–1.22 (m, 2H).

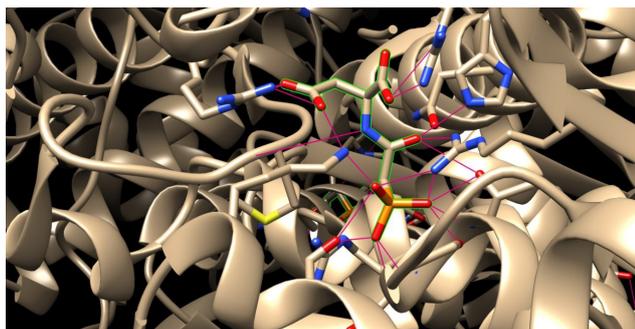
Масс-спектр (LC–MS), m/z ($I, \%$): эксп. 354.336 $[\text{MH}]^+$, 100%; расчет. 354.38 $[\text{MH}]^+$.

N-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)- γ -аминомасляной кислоты (**14**), выход 1.28 г (64%). ^1H ЯМР-спектр (400 МГц, CDCl_3): δ (м.д.) 9.14 (s, 1H), 7.70 (t, $J = 5.7$ Гц, 1H), 4.14 (dt, $J = 8.2, 7.0$ Гц, 4H), 3.32 (q, $J = 6.6$ Гц, 2H), 2.36 (t, $J = 7.3$ Гц, 2H), 1.85 (h, $J = 7.5$ Гц, 2H), 1.54–1.39 (m, 2H), 1.32 (t, $J = 7.1$ Гц, 6H), 1.28–1.15 (m, 2H).

Масс-спектр (LC–MS), m/z ($I, \%$): эксп. 308.059 $[\text{MH}]^+$, 100%; расчет. 308.29 $[\text{MH}]^+$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для прогнозирования приемлемой для связывания с АСТase (код Protein Data Bank 5G1N¹) структуры нами был применён метод молекулярного моделирования с помощью программы AutoDock Vina 1.1.2 [10]. Была проведена оптимизацию геометрических параметров методом молекулярной механики в программе Chimera 1.13.1². Докинг позволил показать, что в структуре АСТase имеется гидрофобный «карман», в который с высокой вероятностью могут встраиваться производные фосфонуксусной кислоты с циклическими заместителями у атома углерода (рис. 3). На осно-



а

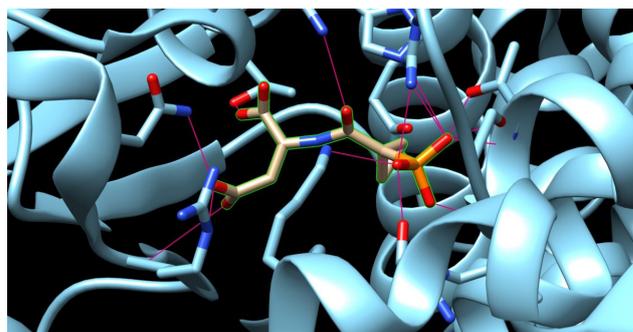
Рис. 3а. Молекула PALA в активном сайте аспарат-транскарбомойлазы (данные рентгеноструктурного анализа; изображение получено с помощью программы Chimera).

Fig. 3a. An *N*-phosphonacetyl-L-aspartate molecule in the active site of aspartate transcarbamoylase (X-ray diffraction data; image obtained using the Chimera software).

вании этого метода также было показано, что замена остатка аминокислоты влияет на константу связывания субстрата с ферментом. Поэтому нами была проведена серия опытов по получению целевых *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)-замещенных аминокислот с различными аминокислотными остатками.

Получение эфиров *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)аминокислот было осуществлено по схеме, представленной на рис. 4. α -Диэтоксифосфорилциклопропанкарбоновая кислота **7** была получена в результате многостадийного синтеза, где в качестве исходных субстратов использовались триэтилфосфит и этиловый эфир хлоруксусной кислоты, которые в результате реакции Арбузова в условиях микроволнового облучения приводили к триэтиловому эфиру фосфонуksусной кислоты **5** [11, 12].

Принимая во внимание наличие активной метиленовой группы в структурах фосфонуксусной кислоты и ее производных, нами был получен полный этиловый эфир α -диэтоксифосфорилциклопропанкарбоновой кислоты **6** в результате реакции межфазного алкилирования 1,2-дибромэтаном триэфира фосфонуксусной кислоты в присутствии диметилсульфоксида и гидроксида калия. Затем триэтиловый эфир α -диэтоксифосфорилциклопропанкарбоновой кислоты подвергался гидролизу в щелочной среде по карбоксильной компоненте, протекавшем с образованием α -диэтоксифосфорилциклопропанкарбоновой кислоты **7** [13, 14].



б

Рис. 3б. Молекула *N*-(α -дигидроксифосфорилциклопропилкарбонил)аспарагиновой кислоты в активном сайте аспарат-транскарбомойлазы (конформация, смоделированная программой Autodock; изображение получено с помощью программы Chimera).

Fig. 3b. An *N*-(α -dihydroxyphosphoryl)cyclopropyl-aspartic acid molecule in the active site of aspartate transcarbamoylase (conformation modeled with Autodock; image obtained with the Chimera software).

¹ <https://www.rcsb.org/structure/5G1N> (дата обращения 01.07.2020) [<https://www.rcsb.org/structure/5G1N> (Accessed July 01, 2020).]

² UCSF Chimera 1.13.1. 2018. <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> (Дата обращения 20.07.2020) [UCSF Chimera 1.13.1. 2018. Available from <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> (Accessed July 20, 2020).]

Заключительным этапом стало проведение реакции взаимодействия α -диэтоксифосфорилциклопропанкарбонной кислоты **7** с рядом эфиров аминокислот: эфирами глицина, метионина, метиловыми эфирами аспарагиновой кислоты и γ -аминоасляной кислоты. Реакция проводилась через получение соответствующего хлорангирида α -диэтоксифосфорилциклопропанкарбонной кислоты, который использовался далее без предварительного выделения и очистки. Проведение реакции при охлаждении до 0 °С в среде сухого хлороформа в присутствии триэтиламина, используемого в качестве основания и акцептора хлористого водорода, позволяет получить с хорошими выходами эфиры *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)-замещенных аминокислот **8–11** (рис. 5).

Полученные эфиры были переведены в кислоты посредством щелочного гидролиза по карбоксильной компоненте (соединения **12–15**).

Синтезированные нами соединения **12–15** были исследованы на цитотоксичность по отношению к клеточным линиям рака молочной железы человека (MDA-MB-231, рис. 6), рака кожи (A-375, рис. 7) и глиобластомы (U-87 MG, рис. 8) по методике, описанной в работе [15].

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью теста, который используется для оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест), основанного на колориметрических измерениях контрольного и испытуемых растворов, которые предварительно инкубировались в среде CO₂ с добавлением раствора МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия). Никотинамидадениндинуклеотидфосфат-Н-зависимые клеточные оксидоредуктазные ферменты живых клеток способны восстанавливать МТТ до соответствующего формазана, имеющего пурпурное окрашивание. Далее проводилась оценка оптической плотности полученных растворов при длинах волн 594 нм и 620 нм. Результаты испытаний представлены на рисунках 6–8.

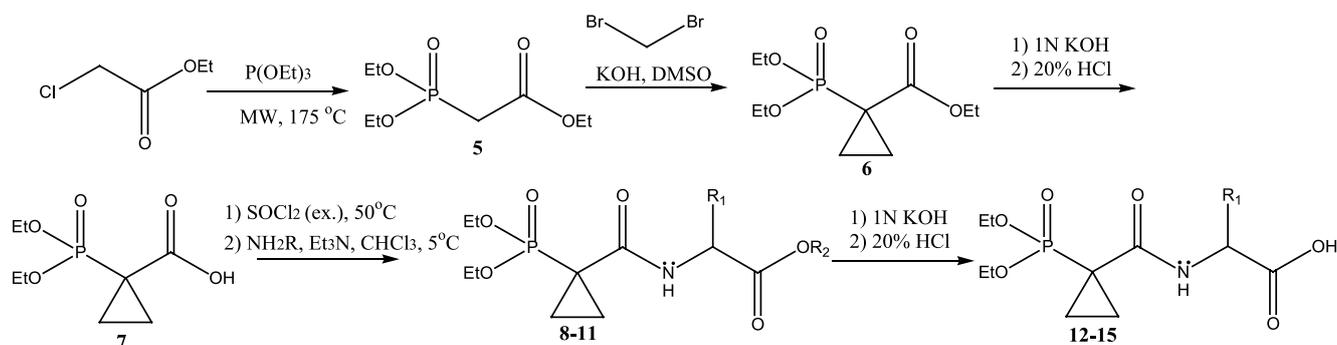


Рис. 4. Общая схема синтеза *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)аминокислот.
Fig. 4. General scheme for the synthesis of *N*-(α -diethoxyphosphorylcyclopropylcarbonyl)amino acids.

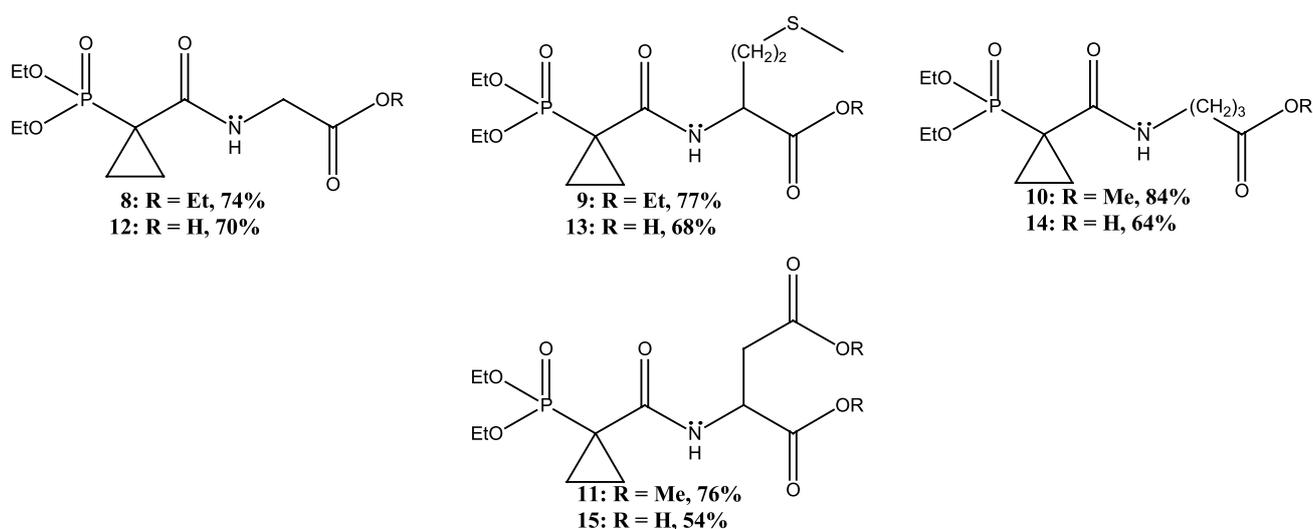


Рис. 5. Ряд полученных *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)аминокислот.
Fig. 5. A series of obtained *N*-(α -diethoxyphosphorylcyclopropylcarbonyl)amino acids, with their respective yields.

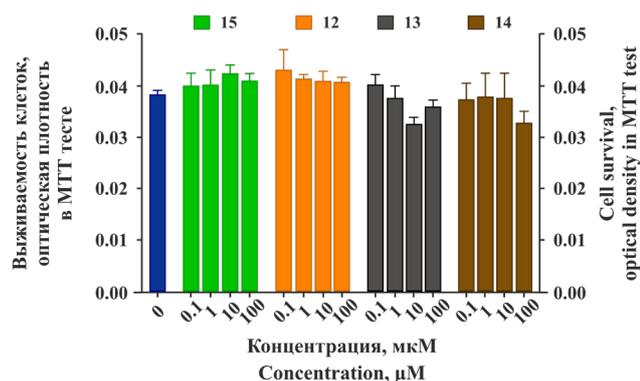


Рис. 6. Выживаемость клеток при различных концентрациях исследуемых соединений в тестах на цитотоксичность против клеточных линий человеческого рака молочной железы.

Fig. 6. Cell survival at various concentrations of the compounds under study as measured in cytotoxicity tests run against human breast cancer cell lines.

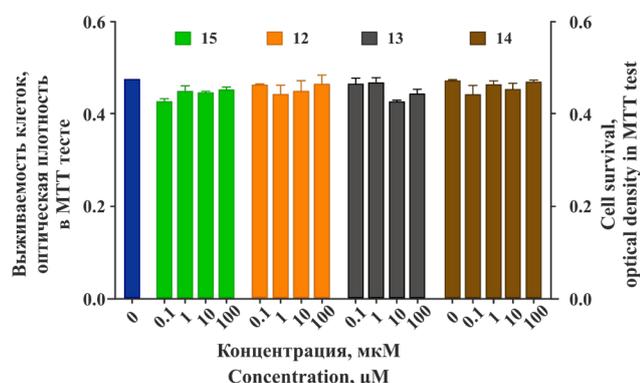


Рис. 7. Выживаемость клеток при различных концентрациях исследуемых соединений в тестах на цитотоксичность против клеточных линий человеческого рака кожи.

Fig. 7. Cell survival at various concentrations of the compounds under study as measured in cytotoxicity tests run against human skin cancer cell lines.

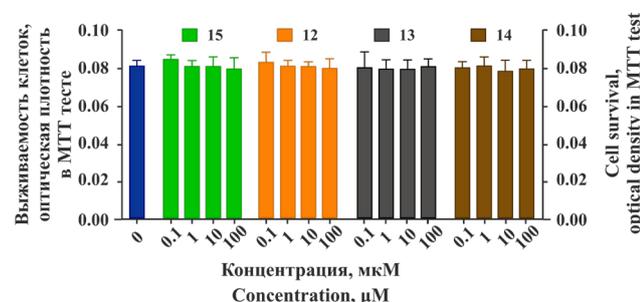


Рис. 8. Выживаемость клеток при различных концентрациях исследуемых соединений в тестах на цитотоксичность против клеточных линий человеческой глиобластомы.

Fig. 8. Cell survival at various concentrations of the compounds under study measured in cytotoxicity tests run against human glioblastoma cell lines.

Отсутствие ожидаемой биологической активности исследуемых соединений может быть обусловлено наличием эфирных групп при атоме фосфора фосфонатной группы [16]. Таким образом, одним из главных направлений дальнейших исследований является синтез *N*-(α -дигидроксифосфорилциклопропилкарбонил)аминокислот и проверка их биологической активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований PALA и молекулярного докинга циклопропанованных аналогов фосфонуксусной кислоты указывают на большой потенциал *N*-(α -дигидроксифосфорилциклопропилкарбонил)-замещенных аминокислот. Тем не менее отрицательные данные по цитотоксичности полученных соединений на использованных в работе клеточных линиях рака не соответствуют ожидаемому результату, что может быть следствием наличия эфирных групп в составе фосфонатной компоненты *N*-(α -диэтоксифосфорилциклопропилкарбонил)аминокислот.

Финансовая поддержка

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

Financial support

This study did not have any financial support from outside organizations.

Вклад авторов

И.С. Кузьмин – концепция и дизайн исследования, проведение исследований, сбор и предоставление материала, написание текста, редактирование.

Д.Ю. Юрьев – проведение исследований, сбор и предоставление материала, написание текста, редактирование, оформление библиографии.

Г.А. Топорков – проведение исследований, сбор и предоставление материала.

А.В. Калистратова – анализ и систематизация материала, написание текста статьи, оформление работы.

Л.В. Коваленко – концепция и дизайн исследования, анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Authors' contribution

I.S. Kuzmin – development of the research design, conducting the study, collecting and providing the material, writing the text of the article, editing the article;

D.Yu. Yuriev – conducting the study, collecting and providing the material, writing the text of the article, editing the article, formalization of the list of references;

G.A. Toporkov – conducting the study, collecting and providing the material;

A.V. Kalistratova – analysis and systematization of the material, writing the text of the article, design of the study;

L.V. Kovalenko – idea, development of the research design, analysis of the scientific work, critical revision with the introduction of valuable intellectual content.

Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов и интересов, связанных с финансовыми или личностными вопросами, которые могли бы повлиять на работу, изложенную в данной статье.

The authors declare that they do not have any conflicts of interest related to financial or personal issues that could affect the work described in this article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Collins K.I., Stark G.R. Aspartate transcarbamoylase. Interaction with the transition state analogue *N*-(phosphonacetyl)-L-aspartate. *J. Biol. Chem.* 1971;246(21):6599-6605. URL: <http://www.jbc.org/content/246/21/6599>
- Ruiz-Ramos A., Velázquez-Campoy A., Grande-García A., Moreno-Morcillo M., Ramon-Maiques S. Structure and Functional Characterization of Human Aspartate Transcarbamoylase, the Target of the Anti-tumoral Drug PALA. *J. Structure.* 2016;24(7):1081-1094. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.05.001>
- Horsman G.P., Zechel D.L. Phosphonate Biochemistry. *Chem. Rev.* 2016;117(8):5704-5783. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00536>
- Demkowicz S., Rachon J., Dasko M., Kozak W. Selected Organophosphorus Compounds with Biological Activity. Applications in Medicine. *RSC Advances.* 2016;6(12):7101-7112. <https://doi.org/10.1039/C5RA25446A>
- Grem J.L., King S.A., O'Dwyer P.J., Leyland-Jones B. Biochemistry and clinical activity of *N*-(phosphonacetyl)-L-aspartate: a review. *Cancer Research.* 1988;48(16):4441-4454.
- Peters G.J. Antipyrinidone effects of five different pyrimidine de novo synthesis inhibitors in three head and neck cancer cell lines. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids.* 2018;37(6):329-339. <https://doi.org/10.1080/15257770.2018.1460479>
- Lei Z., Wang B., Lu Zh., Wang N., Tan H., Zheng J., Jia Z. New regulatory mechanism-based inhibitors of aspartate transcarbamoylase for potential anticancer drug development. *FEBS J.* 2020;287(16):3579-3599. <https://doi.org/10.1111/febs.15220>
- Cemre Manav M., Sofos N., Hove-Jensen B., Brodersen B.E. The Abc of Phosphonate Breakdown: A Mechanism for Bacterial Survival. *BioEssays.* 2018;40(11):1800091-1800102. <https://doi.org/10.1002/bies.201800091>
- Coudray L., Kantrowitz E.R., Montchamp J.L. Submicromolar phosphinic inhibitors of Escherichia coli aspartate transcarbamoylase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2009;19(3):900-902. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.115>
- Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010;31(2):455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Seweryn P., Van L.B., Kjeldgaard M., Russo C.J., Passmore L.A., Hove-Jensen B., Jochimsen B., Brodersen D.E. Structural insights into the bacterial carbon-phosphorus lyase machinery. *Nature.* 2015;525(7567):68-72. <https://doi.org/10.1038/nature14683>
- Balint E., Tajti A., Keglevich G. Application of the Microwave Technique in Continuous Flow Processing of Organophosphorus Chemical Reactions. *Materials.* 2019;12(5):788-803. <https://doi.org/10.3390/ma12050788>
- Grün A., Balint E., Keglevich G. Solid-Liquid Phase C-Alkylation of Active Methylene Containing Compounds under Microwave Conditions. *Catalysts.* 2015;5(2):634-652. <https://doi.org/10.3390/catal5020634>
- Boppudi H.B., Gandavaram S.P., Chamarthi N.R., Mandava V.B. Synthesis of Phosphonates via Michaelis-Arbuzov Reaction. *Curr. Org. Synth.* 2017;14(6):883-903. <https://doi.org/10.2174/1570179414666161230144455>
- Kalistratova A.V., Kovalenko L.V., Oshchepkov M.S., Gamisoniya A.M., Gerasimova T.S., Demidov Yu.A., Akimov M.G. Synthesis of new compounds in the series of aryl-substituted ureas with cytotoxic and antioxidant activity. *Mendeleev Commun.* 2020;30;2:153-156. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2020.03.007>
- Mao J.C., Otis E.R., von Esch A.M., Herrin T.R., Fairgrieve J.S., Shipkowitz N.L., Duff R.G. Structure-activity studies on phosphonoacetate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985;27(2):197-202. <https://doi.org/10.1128/AAC.27.2.197>

Об авторах:

Кузьмин Иван Станиславович, ведущий инженер кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева (125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9). E-mail: kuzka06@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-1542-6931>

Юрьев Данил Юрьевич, магистрант кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева (125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9). E-mail: DanilYuriev35@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0002-5906-4020>

Топорков Григорий Андреевич, магистрант кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева (125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9). E-mail: gtoporkovmail@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-3826-3100>

Калистратова Антониды Владимировна, к.х.н., доцент кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева (125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9). E-mail: avkalistratova@muctr.ru. ResearcherID B-4401-2018. <http://orcid.org/0000-0001-6023-7526>

Коваленко Леонид Владимирович, д.х.н., профессор, заведующий кафедрой химии и технологии биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева (125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9). E-mail: lvkbmp23@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0002-0027-4664>

About the authors:

Ivan S. Kuzmin, Leading Engineer, Department of Chemistry and Technology of Biomedical Drugs, D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (9, Miusskaya pl., Moscow, 125047, Russia). E-mail: kuzka06@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-1542-6931>

Danil Yu. Yuriev, Master Student, Department of Chemistry and Technology of Biomedical Drugs, D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (9, Miusskaya pl., Moscow, 125047, Russia). E-mail: DanilYuriev35@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0002-5906-4020>

Grigori A. Toporkov, Master Student Department of Chemistry and Technology of Biomedical Drugs, D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (9, Miusskaya pl., Moscow, 125047, Russia). E-mail: gtoporkovmail@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-3826-3100>

Antonida V. Kalistratova, Cand. of Sci. (Chemistry), Assistant Professor, Department of Chemistry and Technology of Biomedical Drugs, D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (9, Miusskaya pl., Moscow, 125047, Russia). E-mail: avkalistratova@muctr.ru. ResearcherID B-4401-2018. <http://orcid.org/0000-0001-6023-7526>

Leonid V. Kovalenko, Dr. of Sci. (Chemistry), Professor, Head of the Department of Chemistry and Technology of Biomedical Drugs, D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (9, Miusskaya pl., Moscow, 125047, Russia). E-mail: lvkbmp23@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0002-0027-4664>

*Поступила: 23.09.2020; получена после доработки: 10.10.2020; принята к опубликованию: 17.10.2020.
The article was submitted: September 23, 2020; approved after reviewing: October 10, 2020; accepted for publication: October 17, 2020.*