

Г.А. Желтухина,
Е.И. Ефимова,
*Т.А. Кромова,
*В.Е. Небольсин
*ООО «Фарминтерпрайsez»

СИНТЕЗ И НЕОБЫЧНО ЛЕГКАЯ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ ЦИКЛИЗАЦИЯ В РЯДУ АСПАРТИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИСТАМИНА

УДК 547.781

Осуществлен синтез семейства природных аспартильных производных гистамина и родственных соединений. Исследована побочная реакция необычно легкой циклизации бензиловых эфиров Asp-НА.

Одним из путей дезактивации биогенных аминов в ЦНС животных, находящихся на разных этапах эволюционного развития, является ацилирование их аминогрупп остатками аминокислот, например, β -аланином [1], L-глутаминовой кислотой по γ -карбоксилу. Предполагают [2], что образующиеся в результате γ -L-глутамиламины, как и сами биогенные амины, могут участвовать в нейротрансмиссии [3].

Возможность биосинтеза родственных, а именно N-ацетил-L-аспартильных производных биогенных аминов**, в мозге крысы продемонстрирована в работе Е. Квамме [4]. Основные биологические функции таких соединений к настоящему времени не ясны. Высказано предположение о том, что образование конъюгатов N-ацетиласпарагиновой кислоты (N-Ас-Асп) с биогенными аминами защищает последние от действия моноаминоксидаз и других оксидаз [5]. Кроме того, N-ацетиласпартилгистамин (N-Ас-Асп-НА), возможно, является интермедиатом в биосинтезе N-Ас-Асп-пептидов [6].

Ранее нами был синтезирован и охарактеризован природный пептидоамин – γ -L-глутамилгистамин – из нервных тканей различных животных и установлено его регуляторное действие на важнейшие биохимические системы организма [7].

С целью изучения биологической активности аспартильных производных гистамина нами осуществлен синтез соединений, обнаруженных ранее в гомогенате

мозга мыши [4] и являющихся эндогенными метаболитами ацетиласпарагиновой кислоты: α -, β -N-ацетиласпартилгистамин (N-Ас- α -АспНА 10, N-Ас- β -АспНА 11) и N-ацетиламиносукцинимидогистамин 9. Кроме того, нами были синтезированы α - и β -N-аспартильные производные гистамина (α -АспНА 4, β -АспНА 5) и аминосукцинимидогистамин 6.

Для аспартильных производных гистамина в литературе не приведены методики синтеза и физико-химические константы.

Нами осуществлен синтез соединений данного ряда (4, 5, 6, 9, 10, 11) с использованием методов пептидной химии в растворе [8]. Известно, что при синтезе пептидов, включающих аминокислотную последовательность Asp-His, может протекать реакция образования циклического сукцинимидного производного при действии кислот и оснований. С целью исключения таких воздействий в ходе синтеза на пептидоамин Asp-НА, представляющий собой декарбоксилированный AspHis, для защиты NH_2 - и α - или β -COOH групп аспарагиновой кислоты нами были выбраны соответственно бензилоксикарбонильная (Z-) и бензильная (Bzl-) защитные группы, удаляемые гидрогенолизом. Амидная связь создавалась методом активированных пентафторфениловых эфиров, как наиболее активных из известных. Реакция пептидообразования с эквивалентным количеством гистамина в безводном диметилформамиде, судя по ТСХ, протекала с высоким выходом. При этом, наряду с целевыми продуктами 1 или 2 наблюдалось образование побочного соединения - циклического сукцинимидного производного 3, строение которого подтверждено масс-спектрометрически, (m/z 342.7) (схема 1).

** Далее по тексту и в схемах аспарагиновая кислота в L-форме.

В ходе хроматографирования на колонке для разделения смеси линейного и циклического продуктов и даже при хранении этой смеси содержание побочного продукта увеличивалось практически до 100 %. Вследствие такой необычно легкой циклизации защищенных производных AspHA, разделение смеси соединений **1** или **2** с **3** на этой стадии нам представилось нецелесообразным. Поэтому смесь этих защищенных продуктов

подвергалась гидрированию без выделения. Отделение незащищенных линейных целевых продуктов **4** и **5** от примеси циклического производного **6** проводилось на конечной стадии, используя различную растворимость этих соединений в изопропанол. В результате использования такой схемы выходы α -AspHA и β -AspHA, считая на исходные Z-Asp(OBzl) или Z-Asp-OBzl, удалось повысить до 40 %.

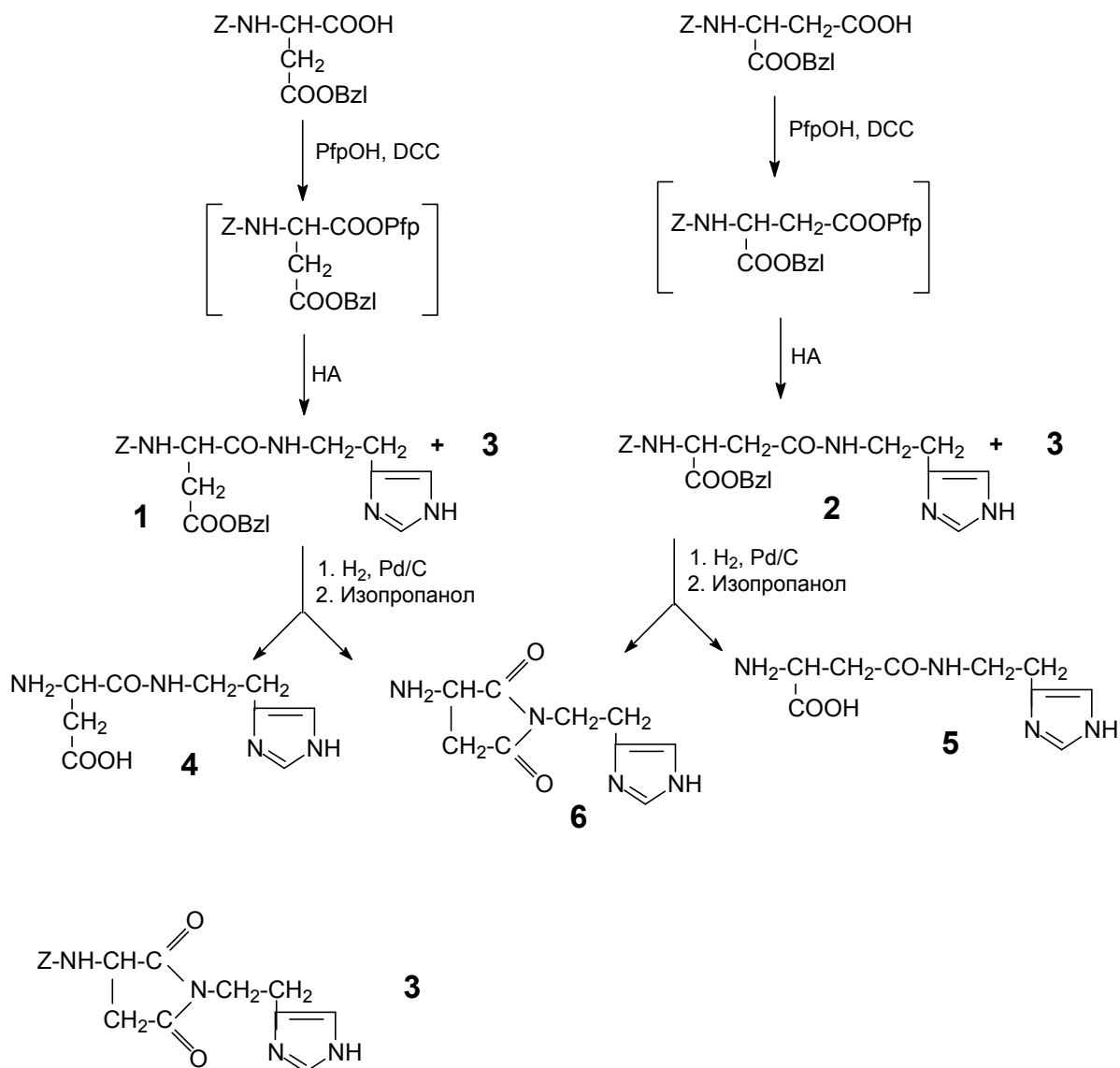


Схема 1. Синтез α -AspHA (**4**), β -AspHA (**5**) и аминсукцинимидогистамина (**6**).

При синтезе ацетильных производных аспартилгистамина в качестве исходных соединений использовали β -AspOBzl или α -AspOBzl. Ацетилирование проводили действием уксусного ангидрида на соответствующие аминсвободные бензиловые эфиры аспарагиновой кислоты в воде.

Реакции активации карбоксильной группы и создания пептидной связи проводились в условиях, описанных выше для Z-защищенных производных (схема 2). При синтезе Ac-производных Asp-HA также наблюдалось образование циклического производного **9**. В отличие от предыдущей

схемы 1, отделение N-Ас- α -Асп(OBzl)НА **7** от соответствующего циклического производного **9** удалось провести непосредственно после реакции пептидообразования, используя различную растворимость этих соединений в хлороформе. Анализ масс- и ПМР спектров продемонстрировал отсутствие бензильной защиты у соединения **9**. Из сравнения ИК-Фурье спектров соединений **7** и **9** видно, что для циклического производного **9** характерна сильная полоса поглощения при 1700 см^{-1} и слабая при 1779 см^{-1} , соответствующие валентным колебаниям карбонильных групп в составе сукцинимидных производных [9]. В то же время в спектре этого соединения исчезала полоса поглощения сложноэфирной связи при 1735 см^{-1} , наблюдаемая в спектре линейного аналога **7**, защищенного по карбоксильной группе бензильной защитой.

N-Ас- α -Асп(OBzl)НА был выделен в индивидуальном состоянии, но вследствие повышенной его склонности к циклизации, протекающей как при непродолжительном хранении, так и в ходе гидрирования на палладиевом катализаторе в безводном метаноле в течение 2 часов, целевой линейный α -АспНА все же не удалось получить в индивидуальном состоянии без дополнительной очистки. Поэтому при синтезе соответствующего N-Ас-пептида β -строения **11**, как и в случае синтеза аминокислотных пептидов, гидрированию подвергалась смесь β -бензилзащищенного пептида **8** и циклического производного **9**, с последующим переосаждением из органических растворителей. Использование данной схемы синтеза позволило нам и в этом случае повысить выход до 50 %, считая на исходный α -АспOBzl.

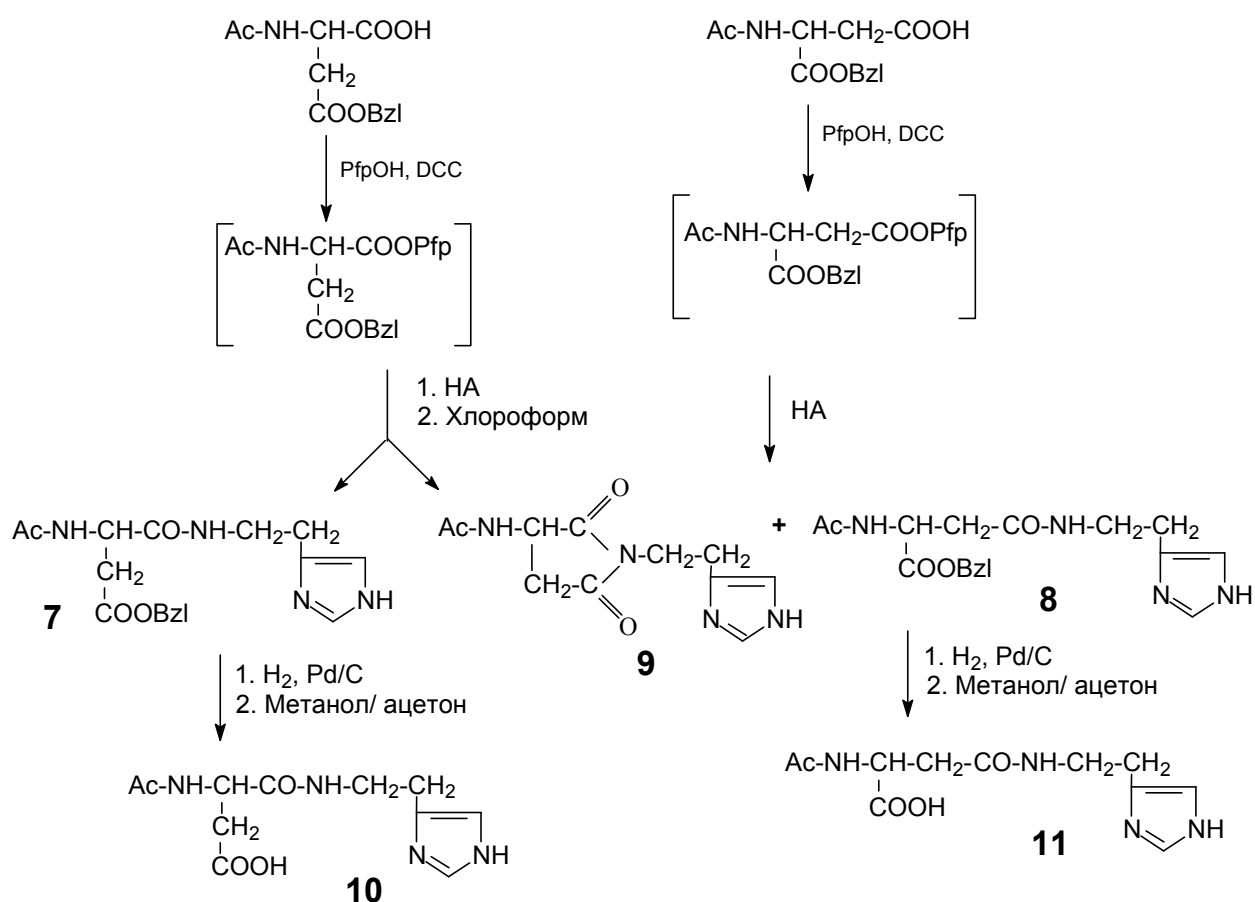


Схема 2. Синтез Ac- α -АспНА (**10**), Ac- β -АспНА (**11**) и N-ацетиламиносукцинимидогистамина (**9**).

Целенаправленный синтез циклических соединений **6** и **9** нами был осуществлен путем обработки реакционной смеси, получаемой после образования пептидной связи, триэтиламино (рН 8) в течение 15 мин, с последующей сушкой в вакууме над CaCl_2 в течение двух часов. Циклическое строение полученных таким образом веществ было подтверждено ИК-Фурье и ^1H -ЯМР спектроскопией, а также масс-спектрометрией.

Индивидуальность полученных соединений проверяли методом ТСХ на пластинках «Kieselgel 60 F₂₅₄» («Merck», Германия) в системе растворителей: изопропанол – вода – аммиак 6:1:3. Хроматограммы проявляли хлор-толидиновым реактивом, реактивом Паули, нингидрином, йодом. Углы оптического вращения измеряли на поляриметре «Perkin Elmer 341» (США). ^1H -ЯМР спектры регистрировали на приборе Bruker AMX-400 (Германия). ИК-Фурье спектры снимали в таблетках KBr на

приборе Nicolet Magna-750 (США). Температуру плавления определяли на приборе Voetius (Германия). Масс-спектры высокого разрешения получали на времяпролётном масс-спектрометре методом матричной лазернодесорбционной ионизации, в качестве матрицы 2,5-дигидрооксибензойная кислота, на приборе REFLEX™ III (Bruker, Германия). Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Waters (США) в условиях: колонка Symmetry 300 C₁₈, 3,9 x 150 мм, 5 мкм, детекция при 214 нм, элюция 0,1%-ной водной TFA с градиентом ацетонитрила от 0% до 60% за 18 мин (1); колонка Separon SGX C₁₈, 3,3 x 150 мм, 7 мкм, детекция при 214 нм, элюция 0,1%-ной водной TFA с градиентом ацетонитрила от 0% до 60% за 30 мин (2); на хроматографе System Gold (США) в условиях: колонка Phenomenex (США) C₁₈, 2 x 250 мм, 5 мкм, детекция при 214 нм, изократическое элюирование 0,1% TFA (3).

Физико-химические характеристики синтезированных соединений:

4: R_f 0.71. T_{пл} 207-209°. Масс-спектр, m/z: [M+H]⁺ 227.0. [α]_D²⁰ – 7.47° (С 0.35; MeOH-H₂O 1:1). ^1H -ЯМР (D₂O) δ: 2.20-2.35 (m, 2H, α-CH₂-HA), 2.5 (t, J 6 Гц, 2H, β-CH₂-Asp), 3.0-3.15; 3.2-3.35 (m, 2H, β-CH₂-HA), 3.65 (t, J 6 Гц, H, α-CH-Asp), 6.7 (s, 1H, 4-CH-Im), 7.6 (s, 1H, 2-CH-Im), ИК-Фурье, ν/cm⁻¹: 3048 (вал. NH₃⁺), 1669 (амид I), 1606, 1402 (вал. COO⁻), 1575, 1500 (деф. NH₃⁺, амид II). Найдено, %: С 47.50; Н 6.20; N 24.32. C₉H₁₄N₄O₃. Вычислено, %: С 47.78; Н 6.24; N 24.76. ВЭЖХ в условиях 1: индивидуальный пик, время удерживания 1.68 мин.

5: R_f 0.67. T_{пл} 196-198°. Масс-спектр, m/z : [M+H]⁺ 227.1. [α]_D²⁰ – 10.52° (С 0.29; MeOH-H₂O 1:1). ^1H -ЯМР, D₂O, δ, м.д.: 2.20-2.35 (m, 4H, β-CH₂-Asp, α-CH₂-HA), 3.12 (t, J 5 Гц, 2H, β-CH₂-HA), 3.61 (dd, J 4 Гц, J 6 Гц, 1H, α-CH-Asp), 6.65 (s, H, 4-CH-Im), 7.45 (s, H, 2-CH-Im). ИК-Фурье, ν/cm⁻¹: 3057 (вал. NH₃⁺), 1626 (амид I), 1567, 1410 (вал. COO⁻), 1597 (деф. NH₃⁺), 1528 (амид II). Найдено, %: С 47.78; Н 6.35; N 24.83. C₉H₁₄N₄O₃. Вычислено, %: С 47.78; Н 6.24; N 24.76. ВЭЖХ в условиях 3: индивидуальный пик, время удерживания 4.32 мин.

6: R_f 0.76. T_{пл} 150-152°. [α]_D²⁵ – 42.72° (С 0.32; MeOH-H₂O (1:1)). Масс-спектр, m/z : [M+H]⁺ 209.0. ^1H -ЯМР, CD₃OD, δ, м.д.: 1.26 (dd, J₁ 5 Гц, J₂ 17 Гц, 1H, β-CH₂-Asp), 1.85 (t, J 5 Гц, 2H, α-CH₂-HA), 2.0 (dd, J₁ 10 Гц, J₂ 17 Гц, H, β-CH₂-Asp), 3.0 (t, J 5 Гц, H, β-CH₂-HA), 3.17 (m, H, α-CH-Asp), 7.21 (s, H, CH-4-Im), 8.14 (s, H, CH-2-Im). ИК-Фурье, ν/cm⁻¹: 3449, 3338 (вал. NH₂), 1781, 1701 (вал. C=O в циклическом имиде), 1560 (деф. NH₂). Найдено, %: С 51.05; Н 5.67; N 26.00. C₉H₁₂N₄O₂. Вычислено, %: С 51.92; Н 5.81; N 26.91.

10: R_f 0.65. T_{пл} 112-114°. [α]_D²⁰ – 1.6° (С 1; H₂O). ^1H -ЯМР (CD₃OD) δ: 1.75 (s, 3H, Ac), 2.40 (d, J 8 Гц, 2H, β-CH₂-Asp), 2.6 (t, J 8 Гц, 2H, α-CH₂-HA), 3.10-3.20 (m, 2H, β-CH₂-HA), 4.31 (t, J 8 Гц, 1H, α-CH-Asp), 6.9 (s, 1H, 4-CH-Im), 8,05 (s, 1H, 2-CH-Im). ИК-Фурье, ν/cm⁻¹ (в пленке): 3319 (вал. NH); 1662 (амид I); 1570 (амид II). Найдено, %: С 49.29; Н

6.32; N 23.80. C₁₁H₁₆N₄O₄. Вычислено, %: C 49.25; H 6.01; N 23.86. ВЭЖХ в условиях 2: время удерживания 6.96 мин.

11: R_f 0.65. Гигроскопичное. [α]_D²⁰ + 6.56° (C 0.27; MeOH-H₂O (1:1)). Масс-спектр, m/z : [M+H]⁺ 269.0. ¹H-ЯМР (CD₃OD) δ: 1.90 (s, 3H, Ac), 2.45-2.70 (m, 2H, β-CH₂-Asp), 2.85 (t, J 6 Гц, 2H, α-CH₂-HA), 3.36-3.48 (m, 2H, β-CH₂-HA), 4.38-4.42 (m, 1H, α-CH-Asp), 7.20 (s, 1H, 4-CH-Im), 8,50 (s, 1H, 2-CH-Im). ИК-Фурье, ν/см⁻¹: 3271 (вал. NH), 1654 (амид I), 1551 (амид II). Найдено, %: C 46.48; H 6.37; N 19.64. C₁₁H₁₆N₄O₄·H₂O. Вычислено, %: C 46.15; H 6.34; N 19.57. ВЭЖХ в условиях 1: время удерживания 4.15 мин.

9: R_f 0.80. T_{пл} 226-228°. [α]_D²⁰ – 8.78° (C 0.41; MeOH-H₂O (1:1)). Масс-спектр, m/z : [M+H]⁺ 251.0. ¹H-ЯМР (CD₃OD+DMSO-d₆) δ: 2.20 (s, 3H, Ac), 2.80-2.95 (m, 1H, β-CH₂-Asp), 3.08 (t, J 9 Гц, 2H, α-CH₂-HA), 3,25 (dd, J 10 Гц, J 22.5 Гц, 1H, β-CH₂-Asp), 3,95 (t, J 9 Гц, 2H, β-CH₂-HA), 4.65-4.75 (m, 1H, α-CH₂-Asp) 7,15 (s, 1H, 4-CH-Im), 7,90 (s, 1H, 2-CH-Im). ИК-Фурье, ν/см⁻¹: 3266 (вал. NH), 1772, 1700 (вал. C=O в циклическом имиде), 1659 (C=O ацетил), 1584 (деф. NH). Найдено, %: C 52.67; H 5.45; N 22.40. C₁₁H₁₄N₄O₃. Вычислено, %: C 52.79; H 5.64; N 22.39. ВЭЖХ в условиях 2: время удерживания 8.91 мин.

ЛИТЕРАТУРА:

1. J. Borycz, J.A. Borycz, M. Loubani and I.A Meinertzhagen, //J. Neurosci. – 2002. – Vol. 22. - P. 10549.
2. В.А. Battelle, М.К. Hart. //Comparative Biochemistry and physiology. – 2002. – Vol.133. – P.135.
3. Н. Konishi, Y. Kakimoto. //J. Neurochem. – 1976. – Vol.27 – P.1461-1463.
4. Е. Kvamme, K.L. Reichelt, P.D. Edminson. //Proceedings of the tenth FEBS meeting. – 1975. – P. 127-136.
5. K.L. Reichelt, E. Wedege, E Kvamme. //J. Neurochem. – 1971. – Vol 18. – P.2129-2136.
6. K.L. Reichelt, E. Kvamme. //J. Neurochem. – 1973. – Vol. 21 – P.849.
7. V.E.Nebolsin, G.A. Zheltukhina, V.V. Krzechkovskaya, V.L. Kovaleva, R.P.Evstigneeva. //Vopr. Med. Chem. – 2001. – Vol. 47 – P.301-307.
8. Э.Гросс, И.Майенхофер Е. Основные методы образования пептидных связей. – М.: Мир, 1983. – 421 с.
9. М.А. Ondetti, A. Deer, T. Sheehan et al. //Biochemistry. – 1968. – Vol. 7 – P. 4069-4075.