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

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-HA.

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-Ac-Asp) с биогенными аминами защищает последние от действия моноаминооксидаз и других оксидаз [5]. Кроме того, N-ацетиласпартилгистамин (N-Ac-Asp-HA), возможно, является интермедиатом в биосинтезе N-Ac-Asp-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-Ac-α-AspHA **10**, N-Ac-β-AspHA **11**) и N-ацетиламиносукцинимидогистамин **9**. Кроме того, нами были синтезированы α- и β-N-аспартильные производные гистамина (α-AspHA **4**, β-AspHA **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-HA, 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 изопропаноле. 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 %.

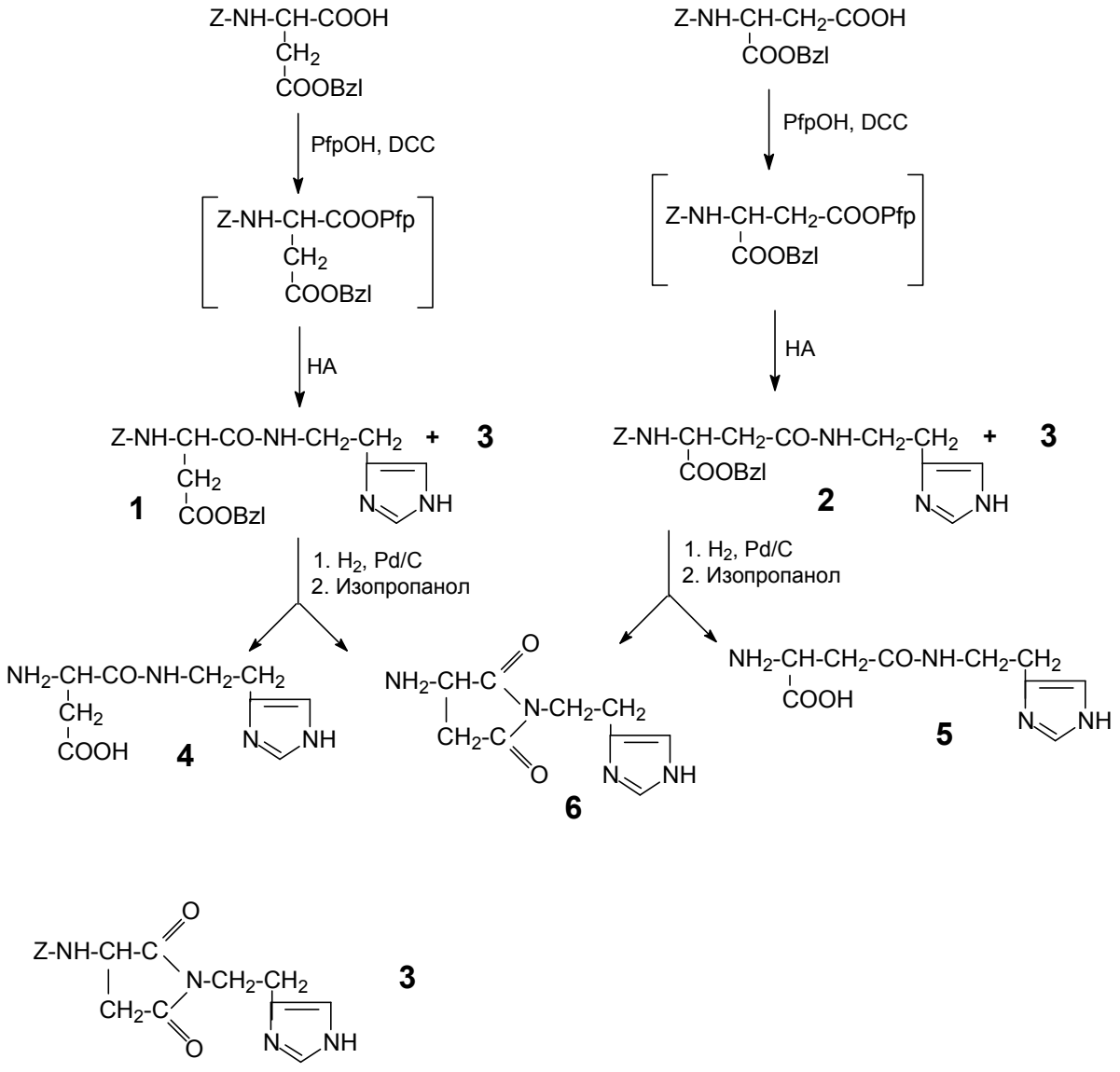

Схема 1. Синтез α-AspHA (4), β-AspHA (5) и аминосукцинимидогистамина (6).

При синтезе ацетильных производных аспартилгистамина в качестве исходных соединений использовали β-AspOBzl или α-AspOBzl. Ацетилирование проводили действием уксусного ангидрида на соответствующие аминосвободные 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-Ac-α-Asp(OBzl)HA **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-Ac-α-Asp(OBzl)HA 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-AspHA все же не удалось получить в индивидуальном состоянии без дополнительной очистки. Поэтому при синтезе соответствующего N-Ac-пептида β-строения **11**, как и в случае синтеза аминосвободных 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-AspOBzl.

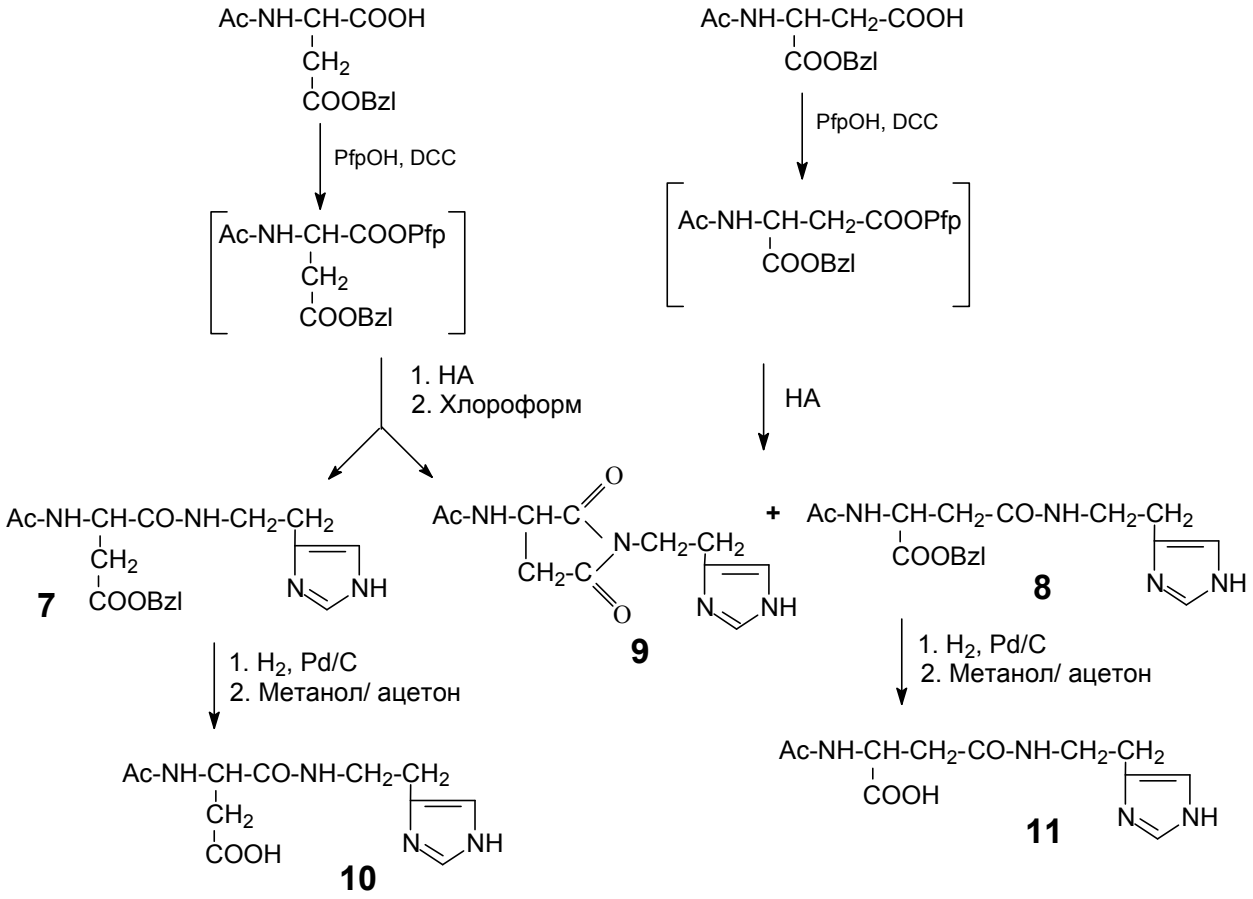

Схема 2. Синтез Ac-α-AspHA (10), Ac-β-AspHA (11) и N-ацетиламиносукцинимидогистамина (9).

Целенаправленный синтез циклических соединений **6** и **9** нами был осуществлен путем обработки реакционной смеси, получаемой после образования пептидной связи, триэтиламином (pH 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 ^{1}H-ЯМР спектроскопией, а также масс-спектрометрией.

Индивидуальность полученных соединений проверяли методом ТСХ на пластинках «Kieselgel 60 F_{254}» («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). ^{1}H-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 Boetius (Германия). Масс-спектры высокого разрешения получали на времяпролётном масс-спектрометре методом матриксной лазернодесорбционной ионизации, в качестве матрицы 2,5-дигидрооксибензойная кислота, на приборе REFLEX^{TM} III (Bruker, Германия). Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Waters (США) в условиях: колонка Symmetry 300 C_{18}, 3,9 x 150 мм, 5 μм, детекция при 214 нм, элюция 0,1%-ной водной TFA с градиентом ацетонитрила от 0% до 60% за 18 мин (1); колонка Separon SGX C_{18}, 3,3 x 150 мм, 7 μм, 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) C_{18}, 2 x 250 мм, 5 μм, 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. $[\alpha]_D^{20}$ – 7.47° (C 0.35; MeOH-H_2O 1:1). ^{1}H-ЯМР (D_2O) δ: 2.20-2.35 (m, 2H, α-CH_2-HA), 2.5 (t, J 6 Гц, 2H, β-CH_2-Asp), 3.0-3.15; 3.2-3.35 (m, 2H, β-CH_2-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/см$^{-1}$: 3048 (вал. NH_3^+), 1669 (амид I), 1606, 1402 (вал. $\underline{CO}O^-$), 1575, 1500 (деф. NH_3^+, амид II). Найдено, %: C 47.50; H 6.20; N 24.32. $C_9H_{14}N_4O_3$. Вычислено, %: C 47.78; H 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. $[\alpha]_D^{20}$ – 10.52° (C 0.29; MeOH-H_2O 1:1). ^{1}H-ЯМР, D_2O, δ, м.д.: 2.20-2.35 (m, 4H, β-CH_2-Asp, α-CH_2-HA), 3.12 (t, J 5 Гц, 2H, β-CH_2-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/см$^{-1}$: 3057 (вал. NH_3^+), 1626 (амид I), 1567, 1410 (вал. $\underline{CO}O^-$), 1597 (деф. NH_3^+), 1528 (амид II). Найдено, %: C 47.78; H 6.35; N 24.83. $C_9H_{14}N_4O_3$. Вычислено, %: C 47.78; H 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°. $[\alpha]_D^{25}$ – 42.72° (C 0.32; MeOH-H_2O (1:1)). Масс-спектр, m/z : $[M+H]^+$ 209.0. ^{1}H-ЯМР, CD_3OD, δ, м.д.: 1.26 (dd, J_1 5 Гц, J_2 17 Гц, 1H, β-CH_2-Asp), 1.85 (t, J 5 Гц, 2H, α-CH_2-HA), 2.0 (dd, J_1 10 Гц, J_2 17 Гц, H, β-CH_2-Asp), 3.0 (t, J 5 Гц, H, β-CH_2-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/см$^{-1}$: 3449, 3338 (вал. NH_2), 1781, 1701 (вал. C=O в циклическом имиде), 1560 (деф. NH_2). Найдено, %: C 51.05; H 5.67; N 26.00. $C_9H_{12}N_4O_2$. Вычислено, %: C 51.92; H 5.81; N 26.91.

10: R_f 0.65. $T_{пл}$ 112-114°. $[\alpha]_D^{20}$ – 1.6° (C 1; H_2O). ^{1}H-ЯМР (CD_3OD) δ: 1.75 (s, 3H, Ac), 2.40 (d, J 8 Гц, 2H, β-CH_2-Asp), 2.6 (t, J 8 Гц, 2H, α-CH_2-HA), 3.10-3.20 (m, 2H, β-CH_2-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/см$^{-1}$ (в пленке): 3319 (вал. NH); 1662 (амид I); 1570 (амид II). Найдено, %: C 49.29; H

6.32; N 23.80. $C_{11}H_{16}N_4O_4$. 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. $[\alpha]_D^{20}$ + 6.56° (C 0.27; MeOH-H_2O (1:1)). Масс-спектр, m/z : $[M+H]^+$ 269.0. ^{1}H-ЯМР (CD_3OD) δ: 1.90 (s, 3H, Ac), 2.45-2.70 (m, 2H, β-CH_2-Asp), 2.85 (t, *J* 6 Гц, 2H, α-CH_2-HA), 3.36-3.48 (m, 2H, β-CH_2-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. $C_{11}H_{16}N_4O_4 \cdot H_2O$. 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°. $[\alpha]_D^{20}$ – 8.78° (C 0.41; MeOH-H_2O (1:1)). Масс-спектр, m/z : $[M+H]^+$ 251.0. ^{1}H-ЯМР (CD_3OD+DMSO-d_6) δ: 2.20 (s, 3H, Ac), 2.80-2.95 (m, 1H, β-CH_2-Asp), 3.08 (t, *J* 9 Гц, 2H, α-CH_2-HA), 3,25 (dd, *J* 10 Гц, *J* 22.5 Гц, 1H, β-CH_2-Asp), 3,95 (t, *J* 9 Гц, 2H, β-CH_2-HA), 4.65-4.75 (m, 1H, α-CH_2-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. $C_{11}H_{14}N_4O_3$. 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. B.A. Battelle, M.K. Hart. //Comparative Biochemistry and physiology. – 2002. – Vol.133. – P.135.
3. H. Konishi, Y. Kakimoto. //J. Neurochem. – 1976. – Vol.27 – P.1461-1463.
4. E. 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. M.A. Ondetti, A. Deer, T. Sheehan et al. //Biochemistry. – 1968. – Vol. 7 – P. 4069-4075.