



УДК 577.152.632*11.042

НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ КАРНОЗИНСИНТЕТАЗЫ НА ОСНОВЕ
АНАЛОГОВ β -АЛАНИЛАДЕНИЛАТА И β -АЛАНИЛФОСФАТА

Хомутов А. Р.

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР,
Москва*

На основании анализа механизмов действия и подходов к регулированию АТР-зависимых синтетаз предлагается использовать для ингибирования карнозинсинтетазы набор стабильных аналогов возможных промежуточных соединений ферментативной реакции — β -аланиладенилата или β -аланилфосфата. Синтезированы 1-амино-3-оксобутан- и 1-амино-3-оксопропанфосфоновые кислоты, их производные, в том числе и 5'-аденозилвые эфиры, а также β -аланинил-АМР и цилиатинил-АМР.

Биологические функции карнозина (β -аланил-*L*-гистидин), открытого в начале века [1] и присутствующего в различных органах и тканях, остаются до настоящего времени неясными. Вместе с тем ему приписывается важная роль в защите организма от кислородного стресса [2–5], функционировании обонятельного аппарата [6, 7], мышечном сокращении [8] и обмене меди [9].

Возможным подходом к установлению конкретных функций этого дипептида на молекулярном уровне могло быть химическое регулирование его содержания в клетке, т. е. избирательное воздействие на ферменты, определяющие метаболизм карнозина: карнозинсинтетазу (КФ 6.3.2.11) и карнозиназу (КФ 3.4.13.3). Настоящая работа посвящена синтезу неизвестных ранее аналогов β -аланиладенилата, вероятного промежуточного соединения в карнозинсинтетазной реакции, как избирательных ингибиторов этого фермента.

Карнозинсинтетаза катализирует образование дипептида из β -аланина и *L*-гистидина с участием АТР в присутствии ионов магния. Известно, что для лиаз этого типа ферментативная активация карбоксильной группы проходит через промежуточное образование ацилфосфатов или ациладенилатов, стабильные аналоги которых обладают свойствами избирательных ингибиторов соответствующих ферментов [10–15]. Для фермента из грудных мышц цыплят найдены условия зависящего от β -аланина АТР-РР-обмена [16] и показано, что карнозин может ферментативно синтезироваться из β -аланиладенилата и *L*-гистидина в отсутствие ионов магния [16]. Таким образом, имелись основания считать β -аланиладенилат промежуточным соединением в ферментативном синтезе карнозина и получать стабильные аналоги именно этого соединения для воздействия на активность фермента. Для карнозинсинтетаз из других источников нельзя исключить образования в качестве интермедиата β -аланилфосфата, что обуславливает необходимость получения и его аналогов.

Соответственно этому одну группу синтезированных аналогов составили вещества, в которых был сохранен карбонильный фрагмент β -аланиладенилата (β -аланилфосфата), но ангидридный кислород отсутствовал или был заменен на метиленовое звено — аденозиновые эфиры β -кето- и α -кетофосфоновых кислот, а также и собственно β -кето- и α -кетофосфоновые кис-

Сокращения: Tfa — трифторацетил, DCC — дициклогексилкарбодимид, TPS — триизопропилбензолсульфокислота, Py — пиридин, THF — тетрагидрофуран.

CHCl_3 , промывали водой, сушили над MgSO_4 . Хлороформный раствор прибавляли с отгонкой CHCl_3 к нагретым до $120\text{--}125^\circ\text{C}$ 8,45 мл (0,05 моль) триэтилфосфита, через 2 ч при 130°C отгоняли избыток триэтилфосфита в вакууме, остаток кипятили 10 ч с 55 мл 20% HCl и после очистки на даэксе 50×8 (100–200 меш, H^+ -форма) и кристаллизации из водного спирта получили 1,2 г (выход 36%) соединения (Ia), т. пл. $171\text{--}172^\circ\text{C}$ (с разл.), R_f 0,22 (B). Найдено, %: С 27,83, Н 6,26; N 8,14. $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_4\cdot 0,25\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 27,99; Н 6,17; N 8,16.

5'-Аденозиловый эфир 1-амино-3-оксобутан-4-фосфоновой кислоты (Iб). К раствору 1,2 г (7,32 ммоль) соединения (Ia) и 2,3 г (23 ммоль) KHCO_3 в 40 мл воды при 0°C прибавляли 1,37 г (8,0 ммоль) Cbz-Cl и перемешивали при этой температуре 12 ч, затем прибавляли еще 0,8 г (8 ммоль) KHCO_3 и 1,37 г (8 ммоль) Cbz-Cl и перемешивали ночь при 0°C , экстрагировали CHCl_3 . Водный слой подкисляли конц. HCl до pH 1–2 и экстрагировали этилацетатом, этилацетатный раствор промывали водой, сушили MgSO_4 . Упаривали досуха, остаток сушили в вакууме над $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ и получили 1,1 г частично закристаллизовавшегося N-Cbz-(Ia), R_f 0,20 (A).

Раствор 0,5 г (1,82 ммоль) N-Cbz-(Ia), 1,0 г (3,07 ммоль) этоксиметиленаденозина и 0,8 г (2,64 ммоль) TPS в 10 мл абс. пиридина оставляли на ночь, упаривали досуха, затем с водой и дважды с изопропанолом. Остаток растворяли в 7 мл смеси $\text{CHCl}_3\text{--CH}_3\text{OH}$ (7:3) и наносили на колонку Silicagel 5/40 мкм (Chemapol, ЧССР), промывали смесью $\text{CHCl}_3\text{--CH}_3\text{OH}$ (7:3) до отсутствия поглощения при 260 нм, а 5'-этоксиметиленаденозиловый эфир 1-(N-Cbz-амино)-3-оксобутан-4-фосфоновой кислоты (R_f 0,70 (A)) элюировали метанолом. Упаривали досуха, остаток растворяли в 20 мл 50% уксусной кислоты и нагревали 45 мин при 60°C , упаривали с водой (4 \times 20 мл), растворяли в 50 мл воды, наносили на колонку с DEAE-целлюлозой DE-32 (50 мл, HCO_3^- -форма) и промывали линейным градиентом вода–0,1 М триэтиламмонийбикарбонат, pH 7,5 (общий объем 1 л). Фракции, содержащие N-Cbz-(Iб), упаривали досуха, затем с водой и спиртом, сушили в вакууме над $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ и переводили в Na-соль действием NaI в метаноле аналогично описанному в работе [20]. Получили 0,15 г (выход 15%) N-Cbz-(Iб), R_f 0,58 (A). ПМР: 8,22 (с, 1H, H-8), 8,00 (с, 1H, H-2), 5,94 (д, 1H, H-1'), 4,10 (м, 2H, 5'- CH_2), 3,21 (т, 2H, $-\text{NH--CH}_2-$, $J_{\text{H--H}}$ 7 Гц), 3,00 (д, 2H, $\text{C(O)--CH}_2\text{--P(O)(OH)-}$, $J_{\text{H--P}}$ 22 Гц), 2,77 (т, 2H, $-\text{CH}_2\text{--C(O)-}$), 7,20–7,00 (м, 5H, ароматич. протоны).

Гидрировали 40 мг (0,07 ммоль) N-Cbz-(Iб) в 3 мл 80% уксусной кислоты над Pd-чернью с количественным выходом получали соединение (Iб), R_f 0,31 (A), 0,47 (B), $E_{\text{адс}}$ 0,85 (B).

5'-Аденозиловый эфир 1-амино-3-оксопропан-3-фосфоновой кислоты (IIб). К раствору 1,7 г (7,75 ммоль) хлорангирида Tfa- β Ala в 10 мл абс. эфира медленно прибавляли 2,75 г (7,75 ммоль) трибензилфосфита и оставляли при 20°C на 3 ч, эфир и хлористый бензил отгоняли в вакууме, остаток растворяли в 5 мл абс. ацетона, прибавляли 1,16 г (7,75 ммоль) безводного NaI и оставляли на ночь при 20°C . Реакционную смесь выливали в 15 мл воды, извлекали эфиром (5 \times 10 мл), эфир промывали водой (2 \times 3 мл), объединенные водные вытяжки подкисляли конц. HCl до прекращения отделения масла, которое экстрагировали дихлорэтаном (4 \times 10 мл). Дихлорэтан сушили MgSO_4 , упаривали, остаток растворяли в метаноле и прибавляли 1 мл абс. пиридина, упаривали досуха и после высушивания в вакууме над $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ получили 2,08 г (выход 64%) пиридиниевой соли монобензильного эфира 1-(N-Tfa-амино)-3-оксопропан-3-фосфоновой кислоты в виде густого масла, R_f 0,59 (A).

Полученное соединение (0,745 г) в 10 мл абс. метанола гидрировали при атмосферном давлении над Pd-чернью, фильтровали, фильтрат упаривали досуха (N-Tfa-(IIa), R_f 0,20 (A)). К остатку в 10 мл абс. пиридина прибавляли 0,49 г (1,5 ммоль) этоксиметиленаденозина, 0,46 г (1,46 ммоль) TPS и оставляли на ночь при 20°C . Упаривали досуха, затем с водой (2 \times 20 мл), растворяли в 25 мл 50% уксусной кислоты и на-

гревали 45 мин при 60° С. Упаривали досуха, затем с водой (4×20 мл), растворяли в 50 мл воды и доводили рН до 7,5 триэтиламино-*N*-Tfa-(IIб) выделяли колоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-32 в HCO₃⁻-форме в линейном градиенте вода — 0,1 М триэтиламинийбикарбонат, рН 7,5, и получали 0,24 г (выход 31%) *N*-Tfa-(IIб), *R_f* 0,65 (А). ПМР: 8,37 (с, 1H, H-8), 8,17 (с, 1H, H-2), 6,07 (д, 1H, H-1', J_{11-11'} 6,0 Гц), 4,16 (м, 2H, 5'-CH₂), 3,44 (т, 2H, —NH—CH₂—), 3,03 (т, 2H, —CH₂—C(O)—).

50 мг (0,1 ммоль) *N*-Tfa-(IIб) инкубировали 3 ч при 20° С в 5 мл 10% раствора аммиака и с количественным выходом получили (IIб). *R_f* 0,16 (А), 0,51 (Б), *E_{до}* 0,88 (В).

1,3-Диаминопропан-3-фосфоновая кислота. К монопиридиновой соли 1-(*N*-Tfa-амино)-3-оксoproпан-3-фосфоновой кислоты (из 0,75 г (1,78 ммоль) монобензильного эфира пиридиновой соли 1-(*N*-Tfa-амино)-3-оксoproпан-3-фосфононовой кислоты, синтез см. выше) в 10 мл насыщенного при 0° С водного раствора аммиака прибавляли в два приема с интервалом в 10 мин раствор 74 мг (2,0 ммоль) NaBH₄ в 2 мл 25% NH₄OH, перемешивали при 0° С еще 30 мин, упаривали досуха, затем с водой, подкисляли 1 М HCl и 1,3-диаминопропан-3-фосфоновою кислоту выделяли хроматографией на дауксе 50×8 (100—200 меш, H⁺-форма). После кристаллизации из воды получили 0,18 г (выход 67%) продукта. *R_f* 0,31 (Б), *E* 0,77* (В). Найдено, %: С 23,21; Н 7,04; Р 19,87. С₈H₁₁N₂O₃P. Вычислено: %: С 23,38; Н 7,19; Р 20,09.

5'-Аденозиловый эфир 3-аминопропанола. К смеси 0,75 г (0,01 моль) 3-аминопропанола, 1,03 г (0,01 моль) триэтиламина в 15 мл THF, охлажденной до —5° С, прибавляли раствор 1,705 г (0,01 моль) Cbz-Cl в 5 мл THF и перемешивали 1 ч. Осадок отфильтровывали, промывали THF, объединенные фильтраты упаривали досуха, остаток растворяли в 20 мл этилацетата, промывали 0,1 М HCl, водой, сушили MgSO₄, упаривали досуха и получали 1,38 г (выход 66%) 3-(*N*-Cbz-амино)пропанола, *R_f* 0,50 (CHCl—CH₂OH, 9:1).

К P¹-аденозил-5'-P²-дифенилпирофосфату (из 0,27 г (0,75 ммоль) AMP и 0,25 мл дифенилхлорфосфата, согласно [21]) прибавляли раствор 0,28 г (1,43 ммоль) 3-(*N*-Cbz-амино)пропанола в смеси пиридин — диметилформамид и перемешивали 3 ч, упаривали досуха и *N*-Cbz-(IIIa) выделяли колоночной хроматографией на целлюлозе DE-32 (Whatman, Англия; 100 мл, HCO₃⁻-форма) в линейном градиенте вода — 0,1 М триэтиламинийбикарбонат, рН 7,5 (1 л воды в смесителе, 1 л 0,1 М буфера в резервуаре) и получили 70 мг *N*-Cbz-(IIIa) в виде густого масла, *R_f* 0,60 (А).

После каталитического гидрирования над Pd-чернью в 5 мл 80% уксусной кислоты получили 45 мг (выход 15%, считая на AMP) (IIIa), *R_f* 0,23 (А), 0,48 (Б), *E_{до}* 0,84 (В), λ_{max} 260 нм.

5'-Аденозиловый эфир 1-амино-3-оксibутан-4-фосфоновою кислоты (IIIб). К 1 мл 2,75·10⁻² М раствора *N*-Cbz-(Iб) в воде прибавляли 0,2 мл 1% раствора NaBH₄ в воде и перемешивали при 20° С 1 ч, подкисляли HCl до рН 3,0, упаривали досуха, затем с метанолом, остаток растворяли в воде и наносили на колонку с дауксом 50×8 (100—200 меш, H⁺-форма, 2 мл), УФ-поглощающие фракции упаривали, Cbz-группу удаляли каталитическим гидрированием над Pd-чернью аналогично (IIIa). Выход соединения (IIIб) 8 мг (73%), *R_f* 0,16 (А), *E_{до}* 0,85 (В).

P¹-(5'-Аденозил)-P²-цилиатинилпирофосфат (IV). К раствору 0,242 г (2 ммоль) цилиатина в 10 мл 0,2 М соляной кислоты прибавляли последовательно 0,365 г (1 ммоль) AMP-кислоты, 50 мл пиридина, 10 г DCC и перемешивали при 20° С 3 сут. Фильтровали, осадок промывали водой, объединенные фильтраты упаривали досуха и выделяли соединение (IV) колоночной хроматографией на целлюлозе DE-32 (Whatman, Англия; 100 мл, HCO₃⁻-форма) в линейном градиенте вода — 0,2 м триэтиламино-

* Подвижность относительно γ-аминомасляной кислоты.

нийбикарбонат, рН 7,5 (1 л воды в смесителе, 1 л 0,2 М буфера в резервуаре). Фракции, содержащие соединение (IV), упаривали досуха и после обессоливания упариванием с водой и спиртом переводили в Na-соль аналогично (Iб). Выход (IV) 160 мг (13%), R_f 0,14 (А), 0,35 (Б), $E_{\text{ад}}^{\text{до}}$ 0,32 (В), $E_{\text{ад}}^{\text{мр}}$ 0,47 (Г).

Дихлоргидрат 1-аминоокси-3-аминопропана. К раствору 4,6 г (0,2 моль) натрия в 100 мл этанола прибавляли при 0°С 20,6 г (0,2 моль) этилового эфира ацетгидроксимовой кислоты [22] и затем в один прием 157 г (1 моль) 1,3-бромхлорпропана, оставляли на ночь при 20°С, этанол упаривали, остаток выливали в воду, экстрагировали CHCl_3 , раствор сушили MgSO_4 и после трех перегонки получили 18,0 г (выход 50%) 1-этоксиэтилиденаминоокси-3-хлорпропана, т. кип. 84–86°С (13 мм рт. ст.), n_D^{22} 1,4448. ПМР: 4,06 (т, 2H, =NOCH₂-), 4,01 (кв, 2H, CH₃CH₂O-), 3,65 (т, 2H, CH₂-Cl), 2,12 (м, 2H, -CH₂-), 1,96 (с, 3H, CH₃-), 1,31 (т, 3H, CH₃-CH₂-), $J_{\text{H-H}}$ 7,0 Гц).

16,0 г (0,084 моль) продукта в 20 мл спирта и 400 мл жидкого аммиака нагревали в автоклаве 24 ч при 80°С, аммиак и спирт отгоняли, остаток выливали в насыщенный раствор NaCl в воде, экстрагировали эфиром и сушили над КОН и после двух перегонки получили 8,7 г (выход 63%) 1-этоксиэтилиденаминоокси-3-аминопропана, т. кип. 85°С (9 мм рт. ст.), n_D^{22} 1,4478. ПМР: 4,01 (кв, 2H, CH₃CH₂O-), 3,99 (т, 2H, =NOCH₂), 2,82 (т, 2H, -CH₂-NH₂-), 1,95 (с, 3H, CH₃-), 1,80 (м, 2H, -CH₂-), 1,30 (т, 3H, CH₃CH₂-), $J_{\text{H-H}}$ 7,0 Гц).

К 3,2 г (0,02 моль) 1-этоксиэтилиденаминоокси-3-аминопропана в 50 мл изопропанола прибавляли 10 мл конц. HCl, через 10–15 мин отфильтровывали осадок, промывали изопропанолом. После перекристаллизации из метанола с этилацетатом получали 3,17 г (выход 90%) дихлоргидрата 1-аминоокси-3-аминопропана, т. пл. 203–204°С (разл.). Найдено, %: С 22,15; Н 7,34; N 16,94. $\text{C}_3\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 22,09; Н 7,42; N 17,18. ПМР: 4,10 (т, 2H, H₂NOCH₂-), 3,10 (т, 2H, H₂NCH₂-), 2,02 (м, 2H, -CH₂-).

Оксим 1-аминоокси-3-аминопропана с 5'-аденозиловым эфиром 1-амино-3-оксобутан-4-фосфоновой кислоты (V). Раствор 50 мг (0,875 ммоль) N-Cbz-(Ia) и 11 мг (0,675 ммоль) дихлоргидрата 1-аминоокси-3-аминопропана в 4 мл 50% спирта доводили до рН 5,0 триэтиламином и оставляли на 2 ч. После прибавления 10 мл воды N-Cbz-(V) выделяли колоночной хроматографией на целлюлозе DE-32 (25 мл, HCO₃⁻-форма), элюируя вещество водой, R_f 0,40 (А).

Cbz-группу удаляли каталитическим гидрированием над Pd-чернью как описано выше и получили 28 мг соединения (V) (выход 80%, считая на аминоксипропиламин), R_f 0,17 (А), $E_{\text{отн}}^{\text{ад}}^{\text{до}}$ 1,23, λ_{max} 260 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gulewitsch W. S., Amiradzibi S. // Ber. Dtsch. Ges. 1900. В. 33. S. 1902–1903.
2. Северин С. Е., Болдырев А. А., Дупин А. М. // Вопр. мед. химии. 1984. Т. 30. № 1. С. 32–36.
3. Дупин А. М., Болдырев А. А., Архипенко Ю. В., Каган В. Е. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1984. Т. 97. № 8. С. 186–188.
4. Болдырев А. А. // Биохимия. 1986. Т. 51. В. 12. С. 1930–1943.
5. Kohen R., Yamamoto Y., Cundy K. C., Ames B. N. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 9. P. 3175–3179.
6. Harding J., Margolis F. L. // Brain Res. 1976. V. 110. № 2. P. 351–360.
7. Hirsh J. D., Grillo M., Margolis F. L. // Brain Res. 1978. V. 158. № 3. P. 407–422.
8. Parker C. J., Ring E. // Comp. Biochem. and Physiol. 1970. V. 37. P. 413–419.
9. Brown C. E. // J. Theor. Biol. 1981. V. 88. № 2. P. 245–256.
10. Göring G., Cramer F. // Chem. Ber. 1973. B. 106. № 8. S. 2460–2467.
11. Southgate C. C. B., Dixon H. B. F. // Biochem. J. 1978. V. 175. № 2. P. 461–466.
12. Cassio D., Lemoine F., Waller J.-P., Sandrin E., Boissonas R. F. // Biochemistry. 1967. V. 6. № 3. P. 827–835.
13. Cassio D., Robert-Gero M., Shire D., Waller J.-P. // FEBS Lett. 1973. V. 35. № 1. P. 112–116.
14. Biryukov A. I., Ishmuratov B. Kh., Khomatov R. M. // FEBS Lett. 1978. V. 19. № 2. P. 249–252.

15. Хомутов Р. М., Осипова Т. И., Бирюков А. И., Ишмурагов Б. Х. // Биорган. химия. 1979. Т. 5. № 12. С. 56-63.
16. Kalyankar G., Meister A. // J. Biol. Chem. 1969. V. 234. № 12. P. 3210-3218.
17. Гуляев Н. Н., Шаркова Е. В., Дедюкина М. М., Северин Е. С., Хомутов Р. М. // Биохимия. 1971. Т. 36. Вып. 6. С. 1267-1273.
18. Kennedy E. P., Weiss S. B. // J. Biol. Chem. 1956. V. 222. № 1. P. 185-191.
19. Яковлева Г. М., Тарусова Н. Б., Бирюков А. И., Хомутов Р. М. // Биорган. химия. 1984. Т. 10. № 2. С. 213-219.
20. Zemlička J., Chláder S. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1969. V. 34. P. 1007-1014.
21. Michelson J. A. // Biochim. et biophys. acta. 1964. V. 94. № 1. P. 1-13.
22. Хомутов Р. М., Северин Е. С., Гнучев Н. В., Деревянко Т. Я. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1967. № 8. С. 1820-1823.

Поступила в редакцию
3.III.1988

После доработки
2.XI.1988

NEW CARNOSINE SYNTHETASE INHIBITORS DERIVED FROM β -ALANYL ADENYLATE AND β -ALANYL PHOSPHATE

KHOMUTOV A. R.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

On the basis of analyses of approaches to regulation of ATP-dependent synthetases and their mechanisms of action, a number of stable analogues of hypothetical intermediates of the β -Ala-His (carnosine) biosynthesis are designed as inhibitors of carnosine synthetase. Syntheses of 1-amino-3-ketobutane- and 1-amino-3-ketopropanephosphonic acids and their derivatives including 5'-adenosyl esters, as well as of β -alaninol-AMP and celliatinyl-AMP are described.