



УДК 577.152.111*1'.135:547.[495.3+496.3].057

СИНТЕЗ 1-ГИДРОКСИАЛКИЛ-3-ЗАМЕЩЕННЫХ МОЧЕВИН И ТИОМОЧЕВИН КАК СУБСТРАТОВ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ

© 2001 г. О. Н. Леонов*, В. М. Щербаков*, В. М. Девиченский*#, Л. Ю. Крюкова, Е. А. Воронцов, С. Л. Кузнецов, Л. Н. Крюков

Центр медико-биологических и экологических проблем РАЕН,
113149, Москва, Симферопольский б-р, 8;

* Институт биологической медицины, Москва

Поступила в редакцию 01.11.2000 г. Принята к печати 11.01.2001 г.

Синтезирован ряд 1-(2-гидроксиэтил)- и 1-(3-гидроксипропил)-3-замещенных мочевины и тиомочевины. Показано, что 1-(3-гидроксипропил)-3-ацилтиомочевины *in vitro* являются специфичными субстратами алкогольдегидрогеназы.

Ключевые слова: мочевины, 1,3-дизамещенные; тиомочевина, 1,3-дизамещенные; алкогольдегидрогеназа, субстраты.

Несмотря на успехи медицины по лечению хронического алкоголизма, набор лекарственных средств для коррекции этой патологии невелик [1, 2]. В связи с этим поиск соединений, влияющих на биотрансформацию этанола, по-прежнему актуален.

В настоящей работе объектами изучения стали 1-гидроксиалкил-3-замещенные мочевины и тиомочевины, имеющие некоторое структурное сходство с препаратом тетурам (дисульфирам) [2, 3] и содержащие первичную спиртовую группу.

Синтез (тио)мочевины (I)–(X) осуществляли взаимодействием соответствующего изо(тио)цианата с 2-аминоэтанолом и (или) 3-аминопропанолом (схема 1).

1-(3-Гидроксипропил)-3-ацилтиомочевины (XI) и (XII) были получены как указано на схеме 2.

В опытах *in vitro* были определены значения кинетических параметров реакции окисления синтезированных соединений (I)–(XII) типичной изоформой алкогольдегидрогеназы печени человека (ADH) [4]. В качестве параметра, характеризующего субстратные свойства тестируемых соединений при их низких концентрациях и, по-видимому, отражающего ситуацию *in vivo* [5], было выбрано отношение относительной максимальной скорости реакции окисления (по сравнению с этанолом, $V_{0, \text{эт}}$) к константе Михаэлиса (K_m) (таблица).

Из таблицы видно, что в ряду рассматриваемых соединений наблюдается тенденция увеличения субстратной специфичности по отношению к

ADH при переходе от гидроксиэтильных производных мочевины (I)–(III) к гидроксипропильным (IV)–(XII), от мочевины (I)–(VII) к тиомочевинам (VIII)–(X) и ацилтиомочевинам (XI), (XII). При этом свойства 1-(3-гидроксипропил)-3-(4-фторбензоил)тиомочевины (XII), как наиболее активного субстрата ADH данного ряда, заслуживают особого внимания.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности последующих изысканий высокоспецифичных субстратов ADH в ряду 1-(3-гидроксипропил)-3-ацилтиомочевины и могут быть использованы при конструировании новых лекарств соответствующего профиля действия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

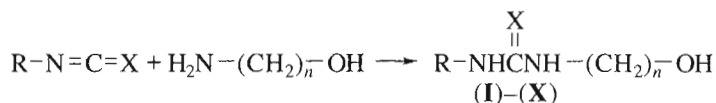
В работе использовали следующие реактивы: 2-аминоэтанол, 3-аминопропанол, бензоилхлорид, 4-фторбензоилхлорид (Merck, ФРГ); *n*-бутилизотиоцианат, *tert*-бутилизотиоцианат, фенилизотиоцианат, этилизотиоцианат, 3,4-дихлорфенилизотиоцианат, 4-фторфенилизотиоцианат, 2,5-ксилилизотиоцианат (Fluka AG, Швейцария). Остальные реактивы и растворители – отечественного производства.

Температуры плавления определяли на приборе Mettler FP62 (Швейцария).

Спектры ^1H -ЯМР получали на спектрометре Bruker WD-80SY (ФРГ) с рабочей частотой 80 МГц в $\text{DMSO}-d_6$ (Fluka AG, Швейцария). Химические сдвиги групп протонов (в шкале δ , м.д.) измеряли относительно остаточного сигнала растворителя (δ 2.49 м.д.).

Сокращение: ADH – алкогольдегидрогеназа.

Автор для переписки (тел./факс: (095) 482-20-91; e-mail: doctor.bio@mtu-net.ru).



R	X	n		R	X	n	
<i>n</i> -C ₄ H ₉	O	2	(I)	C ₆ H ₅	O	3	(VI)
<i>t</i> -C ₄ H ₉	O	2	(II)	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	O	3	(VII)
C ₆ H ₅	O	2	(III)	C ₂ H ₅	S	3	(VIII)
<i>n</i> -C ₄ H ₉	O	3	(IV)	4-FC ₆ H ₄	S	3	(IX)
<i>t</i> -C ₄ H ₉	O	3	(V)	2,5-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃	S	3	(X)

Схема 1.

Количественный элементный анализ веществ осуществляли на CHN-анализаторе Carlo Erba 1106 (Италия).

Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Hitachi 557 (Япония).

1-(2-Гидроксиэтил)-3-*n*-бутилмочевина (I). К раствору 2.16 г (35.4 ммоль) 2-аминоэтанола в 15 мл сухого эфира прибавляли при интенсивном перемешивании 3.50 г (35.3 ммоль) *n*-бутилизоцианата. Смесь перемешивали 1 ч. Осадок производного мочевины (I) отфильтровывали и перекристаллизовывали из 95% спирта. Выход 5.12 г (91%), т. пл. 66–67°C (этанол); спектр ¹H-ЯМР: 0.90 т (3H, CH₃), 1.40 м (2H, CH₂), 1.65 м (4H, 2CH₂), 3.40 м (4H, CH₂N, CH₂O). Найдено, %: C 52.54; H 10.17; N 17.19. C₇H₁₆N₂O₂. Вычислено, %: C 52.48; H 10.07; N 17.48.

1-(2-Гидроксиэтил)-3-*трет*-бутилмочевину (II) получали аналогично производному мочевины (I) из 1.03 г (16.9 ммоль) 2-аминоэтанола и 1.68 г (16.9 ммоль) *трет*-бутилизоцианата. Выход аморфного продукта 2.50 г (93%); спектр ¹H-ЯМР: 1.30 с (9H, 3CH₃), 3.15 м и 3.65 м (4H, CH₂N, CH₂O). Найдено, %: C 52.61; H 9.89; N 17.25. C₇H₁₆N₂O₂. Вычислено, %: C 52.48; H 10.07; N 17.48.

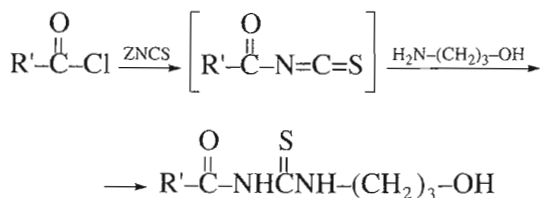
1-(2-Гидроксиэтил)-3-фенилмочевину (III) получали аналогично производному мочевины (I) из 4.36 г (71.4 ммоль) 2-аминоэтанола и 8.50 г (71.4 ммоль) фенилизоцианата. Выход 11.92 г (93%), т. пл. 123°C (этанол); спектр ¹H-ЯМР: 3.60 м (4H, CH₂N, CH₂O), 7.20 м (5H, C₆H₅). Найдено, %: C 60.16; H 6.47; N 15.35. C₉H₁₂N₂O₂. Вычислено, %: C 59.99; H 6.71; N 15.55.

1-(3-Гидроксипропил)-3-*n*-бутилмочевину (IV) получали аналогично производному мочевины (I) из 3.56 г (47.4 ммоль) 3-аминопропанола и 47.0 г (47.4 ммоль) *n*-бутилизоцианата. Выход 7.76 г (94%), т. пл. 66–67°C (этанол); спектр ¹H-ЯМР: 0.90 т (3H, CH₃), 1.40 м (2H, CH₂), 1.65 м (4H, 2CH₂), 3.15 м и 3.60 м (6H, 2CH₂N, CH₂O). Найдено, %: C 55.21; H 10.32; N 15.96. C₈H₁₈N₂O₂. Вычислено, %: C 55.15; H 10.41; N 16.08.

1-(3-Гидроксипропил)-3-*трет*-бутилмочевину (V) получали аналогично производному мочевины (I) из 0.80 г (10.7 ммоль) 3-аминопропанола и 2.00 г (20.2 ммоль) *трет*-бутилизоцианата. Выход аморфного продукта 2.31 г (78%); спектр ¹H-ЯМР: 1.30 с (9H, 3CH₃), 1.65 м (2H, CH₂), 3.15 т и 3.60 т (4H, CH₂N, CH₂O). Найдено, %: C 55.31; H 10.25; N 15.84. C₈H₁₈N₂O₂. Вычислено, %: C 55.15; H 10.41; N 16.08.

1-(3-Гидроксипропил)-3-фенилмочевину (VI) получали аналогично производному мочевины (I) из 1.00 г (13.3 ммоль) 3-аминопропанола и 1.59 г (13.2 ммоль) фенилизоцианата. Выход 2.13 г (82%), т. пл. 113–114°C (этанол); спектр ¹H-ЯМР: 1.74 м (2H, CH₂), 3.30 м и 3.62 м (4H, CH₂N, CH₂O), 7.20 м (5H, C₆H₅). Найдено, %: C 62.03; H 7.12; N 14.28. C₁₀H₁₄N₂O₂. Вычислено, %: C 61.84; H 7.27; N 14.42.

1-(3-Гидроксипропил)-3-(3,4-дихлорфенил)мочевину (VII) получали аналогично производному мочевины (I) из 0.80 г (10.7 ммоль) 3-аминопропанола и 2.00 г (10.6 ммоль) 3,4-дихлорфенилизоцианата. Выход продукта 1.65 г (59%); спектр ¹H-ЯМР: 1.75 м (2H, CH₂), 3.25 м и 3.65 м (4H, CH₂N, CH₂O),



R'	Z	
C ₆ H ₅	NH ₄	(XI)
4-FC ₆ H ₄	Na	(XII)

Схема 2.

Кинетические параметры реакции окисления 1,3-дизамещенных (тио)мочевин АДН*

Соединение	Интервал концентраций, мМ	$V_{отн}$	K_m , мМ	$V_{отн}/K_m$
(I)	0.04–0.6	0.08	0.21	0.38
(II)	0.04–0.6	0.07	0.27	0.26
(III)	0.1–1.4	0.11	0.46	0.24
(IV)	0.04–0.6	0.12	0.16	0.75
(V)	0.5–2.4	0.19	1.18	0.16
(VI)	0.05–0.3	0.16	0.10	1.60
(VII)	0.1–1.6	0.23	0.52	0.44
(VIII)	0.4–4.1	0.18	1.37	0.13
(IX)	0.04–0.4	0.23	0.07	3.30
(X)	0.1–0.5	0.18	0.20	0.90
(XI)	0.1–0.5	0.79	0.21	3.76
(XII)	0.1–1.6	2.71	0.54	5.00

* Алкогольдегидрогеназа печени человека (алкоголь: NAD^+ -оксиредуктаза, КФ 1.1.1.1).

7.50 м (3H, C_6H_5). Найдено, %: С 45.93; Н 4.51; N 10.44. $C_{10}H_{12}Cl_2N_2O_2$. Вычислено, %: С 45.65; Н 4.60; N 10.55.

1-(3-Гидроксипропил)-3-этилтиомочевину (VIII) получали аналогично производному мочевины (I) из 1.78 г (23.7 ммоль) 3-аминопропанола и 2.00 г (23.0 ммоль) этилизотиоцианата. Выход 3.21 г (86%), т. пл. 86–87°C (этанол); спектр 1H -ЯМР: 1.15 т (3H, CH_3), 1.75 м (2H, CH_2), 3.55 м (4H, CH_2N , CH_2O). Найдено, %: С 44.51; Н 8.80; N 17.67. $C_6H_{14}N_2OS$. Вычислено, %: С 44.41; Н 8.70; N 17.26.

1-(3-Гидроксипропил)-3-(4-фторфенил)тиомочевину (IX) получали аналогично производному мочевины (I) из 1.22 г (16.2 ммоль) 3-аминопропанола и 2.50 г (16.3 ммоль) 4-фторфенилизотиоцианата. Выход 3.20 г (86%), т. пл. 112–113°C (этанол); спектр 1H -ЯМР: 1.80 м (2H, CH_2), 3.80 м (4H, CH_2N , CH_2), 7.15 м (4H, C_6H_4). Найдено, %: С 52.90; Н 5.63; N 12.13. $C_{10}H_{13}FN_2OS$. Вычислено, %: С 52.61; Н 5.74; N 12.27.

1-(3-Гидроксипропил)-3-(2,5-ксилил)тиомочевину (X) получали аналогично производному мочевины (I) из 0.50 г (66.6 ммоль) 3-аминопропанола и 1.09 г (66.8 ммоль) 2,5-ксилилизотиоцианата. Выход 1.07 г (67%), т. пл. 97°C (этанол); спектр 1H -ЯМР: 1.75 м (2H, CH_2), 2.20 с и 2.30 с (6H, $2CH_3$), 4.60 м (4H, CH_2N , CH_2O), 7.05 м (3H, C_6H_3). Найдено, %: С 60.29; Н 7.67; N 11.49. $C_{12}H_{18}N_2OS$. Вычислено, %: С 60.47; Н 7.61; N 11.75.

1-(3-Гидроксипропил)-3-бензоилтиомочевина (XI). К суспензии 7.61 г (100 ммоль) роданида аммония в 25 мл горячего безводного ацетона прибавляли 14.06 г (100 ммоль) бензоилхлорида, смесь кипятили 5 мин, охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Фильтрат прибавляли по каплям к раствору 7.51 г (100 ммоль)

3-аминопропанола в 25 мл ацетона. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, а затем выливали в 10-кратный объем воды. Выпавший осадок производного тиомочевины (XI) отделяли и перекристаллизовывали из водного ацетона. Выход 17.60 г (74%), т. пл. 83–84°C (ацетон–вода); спектр 1H -ЯМР: 1.90 м (2H, CH_2), 3.70 м (4H, CH_2N , CH_2O), 7.70 м (5H, C_6H_5). Найдено, %: С 56.00; Н 6.23; N 11.43. $C_{11}H_{14}N_2O_2S$. Вычислено, %: С 55.44; Н 5.92; N 11.76.

1-(3-Гидроксипропил)-3-(4-фторбензоил)тиомочевину (XII) получали аналогично производному тиомочевины (XI) из 3.12 г (38.5 ммоль) тиоцианата натрия, 6.10 г (38.5 ммоль) 4-фторбензоилхлорида и 2.90 г (38.6 ммоль) 3-аминопропанола. Выход 4.31 г (44%), т. пл. 85–86°C (ацетон–вода); спектр 1H -ЯМР: 1.90 м (2H, CH_2), 3.80 м (4H, CH_2N , CH_2O), 7.50 м (4H, C_6H_4). Найдено, %: С 51.13; Н 5.08; N 10.54. $C_{11}H_{13}FN_2O_2S$. Вычислено, %: С 51.55; Н 5.11; N 10.93.

Определение субстратных свойств соединений (I)–(XII) по отношению к АДН. Алкогольдегидрогеназу выделяли из гомогената печени человека согласно работе [6]. Гомогенат центрифугировали при 30000g в течение 10 мин, супернатант отбирали и повторно центрифугировали при 105000g в течение 120 мин. Полученный супернатант лиофилизировали, остаток растворяли в буфере (20 мМ Трис-НCl, pH 8.2) и наносили на колонку (2.3 × 50 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной тем же буферным раствором. Фракцию, содержащую АДН (контроль по поглощению при 280 нм и по дегидрогеназной активности), собирали при элюировании в условиях линейного градиента концентрации Трис-НCl (pH 7.4) от 0 до 1 М (фракция АДН соответствовала диапазону концентраций 0.46–0.52 М)

и лиофилизировали до конечной концентрации белка 1–2 мг/мл. Препарат хранили при -80°C .

Определение активности АДН проводили спектрофотометрическим методом по увеличению оптического поглощения при 340 нм. Реакцию начинали прибавлением этанола или испытуемого вещества (I)–(XII) в DMSO (в конечных концентрациях, указанных в таблице) к раствору (3 мл), содержащему 0.1 мг/мл препарата АДН, насыщающую концентрацию NAD^+ (3×10^{-3} М) в 50 мМ пирогосфатном буфере (рН 7.4). Для расчета количества образовавшегося NADH использовали коэффициент молярного поглощения (ϵ), равный $6210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Величины K_m и $V_{\text{отн}}$ определяли графически в координатах Лайнуивера–Берка [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. 8 изд. / Гл. ред. Ю.Ф. Крылов. М.: РЛС-2001, 2000. С. 1237.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Ч. II. 12-е изд. перераб. и доп. М.: Медицина, 1993. С. 239.
3. Машковский М.Д. Лекарства XX века. М.: Новая волна, 1998. С. 108.
4. Fon Warburg J.P., Papenberg J., Aebi H. // *Can. J. Biochem.* 1965. V. 43. P. 889–895.
5. Энтин Г.М. Лечение алкоголизма. М.: Медицина, 1990. 415 с.
6. Yin S. J., Bosron W.S., Magnes L.J. et al. // *Biochemistry.* 1984. V. 23. P. 5847–5853.
7. Lineweaver H., Burk D. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1934. V. 56. P. 658–660.

Synthesis and Activity of 1-Hydroxyalkyl-3-substituted Ureas and Thioureas, Substrates for Alcohol Dehydrogenase

O. N. Leonov*, V. M. Shcherbakov*, V. M. Devichensky*, L. Yu. Kryukova**,
E. A. Vorontsov**, S. L. Kuznetsov**, and L. N. Kryukov**

e-mail: doctor.bio@mtu-net.ru.

**Institute of Biological Medicine, ul. Akademika Oparina 4, Moscow, 117815 Russia*

***Center of Medical, Biological, and Ecological Problems, Russian Academy of Natural Sciences, Simferopolskii bulvar 8, Moscow, 113149 Russia*

A series of 1-(2-hydroxyethyl)- and 1-(3-hydroxyethyl)-3-substituted ureas and thioureas were synthesized. 1-(3-Hydroxyethyl)-3-acylthioureas were shown to be specific substrates for alcohol dehydrogenase *in vitro*. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: alcohol dehydrogenase, substrates; thiourea, 1,3-disubstituted; urea, 1,3-disubstituted