

Синтез новых полусинтетических аминокислот на основе реакции L-цистеина и α -цианацетиленовых спиртов

Борисова А.П.,* Шемякина О.А., Степанов А.В., Трофимов Б.А.

Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, ул. Фаворского, 1, Иркутск, 664033.
Факс: +7 3952 41 9346; e-mail: shemyakina@irioch.irk.ru

L-Цистеин реагирует с α -цианацетиленовыми спиртами в биомиметических условиях (H_2O , 20-25°C, 4 ч) хемо-, регио- и стереоспецифически исключительно меркаптогруппой, образуя практически с количественным выходом оптически активные аминокислоты, имеющие Z-конфигурацию относительно этиленового фрагмента. В присутствии следовых количеств NaOH (0.6 масс%) синтезированные производные цистеина подвергаются типичной домино-трансформации, образуя цистиноподобные аминокислоты в виде бисцивтер-ионов.

Введение

Аминокислоты – основной строительный материал для синтеза белков, ферментов, гормонов и многих других биологически важных соединений. Модифицированные различными фармакофорными заместителями (полусинтетические) аминокислоты широко используются для направленного синтеза веществ с заданной биологической активностью. Они находят применение при разработке бионаноматериалов в тканевой инженерии, а также служат маркерами транспорта лекарств в живых организмах.¹

Успехи протеомики стимулируют интерес к полусинтетическим аминокислотам. Использование таких аминокислот в пептидном синтезе позволяет контролировать активность биологически важных пептидов. Потребность в новых пептидных структурах для дизайна лекарств в настоящее время неизменно растет.

Цистеин является важной аминокислотой для поддержания целостности клеточных систем путем регулирования их окислительно-восстановительных процессов и детоксикации вредных соединений, включая свободные радикалы и активный кислород.² В медицинской химии интенсивно изучаются цистеиновые протеазы папаинового класса такие как катепсины В, L, К и S, поскольку они имеют отношение к таким заболеваниям как остеопороз, метастазы рака, рематоидный артрит, астма и инфекционные заболевания.³

Ряд производных цистеина, например S-метил-, S-этил-, S-пропил-, S-аллил- и N-ацетилцистеины, найденные в чесноке, проявляют ферментативную и антиоксидантную активность. Кроме того, они снижают концентрацию фибронектина, транглутаминазы и холестерина в плазме и печени. Следовательно, эти соединения обладают защитными эффектами для профилактики болезней сердечно-сосудистой системы.⁴

Таким образом, важной задачей органического синтеза является поиск новых подходов к химической модификации цистеина. Практический интерес представляют высокоэффективные хемо-, регио- и стереоселективные функционализации, протекающие в мягких (биомиметических) условиях

и обеспечивающие изомерную чистоту полученных продуктов.

В настоящей работе мы сообщаем о новом методе селективной модификации L-цистеина доступными⁵ α -цианацетиленовыми спиртами.

Результаты и обсуждение

L-Цистеин реагирует с α -цианацетиленовыми спиртами **1a-g** в мягких условиях (вода, 20-25°C, 4 ч), хемо-, регио- и стереоспецифически образуя оптически активные аминокислоты **2a-g** исключительно Z-конфигурации с выходом 91-98% (схема 1).⁶

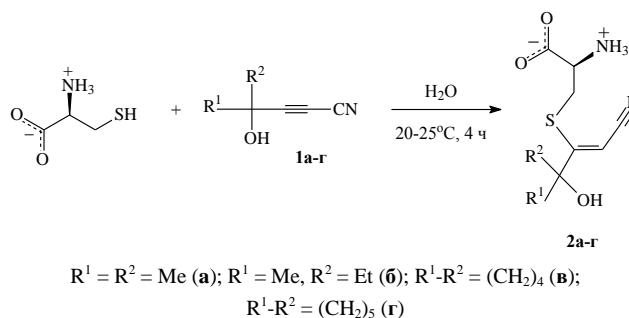


Схема 1. Реакция L-цистеина с α -цианацетиленовыми спиртами **1a-g**

Для доказательства структуры аминокислот **2a-g** использовали методы ЯМР ^1H , ^{13}C , 2D NOESY (^1H - ^1H) и НМВС (^1H - ^{13}C), а также ИК спектроскопии.

Наличие в спектрах ЯМР ^1H (D_2O) аминокислот **2a-g** одного синглета олефинового водорода (6.20-6.07 м.д.) свидетельствует об образовании одного изомера, имеющего Z-конфигурацию, поскольку присоединение нуклеофильных реагентов к ацетиленам в протогенных средах обычно протекает согласовано по схеме транс-присоединения,⁷ приводя к продуктам с Z-конфигурацией, а выделенные аминокислоты не циклизуются в иминодигидрофураны, что является характерным свойством аддуктов α -цианацетиленовых спиртов, имеющих E-конфигурацию.⁸ Для аддукта **2б** в спектрах ЯМР наблюдается удвоение сигналов протонов и углеродов, что свидетельствует об образовании двух диастереомеров.

Z-Конфигурация аддуктов **2а-г** однозначно подтверждается 2D NOESY (^1H - ^1H) спектроскопией соединения **2а**, где наблюдаются кросс-пик между сигналами олефинового протона и протонами метильной группы (рис. 1).

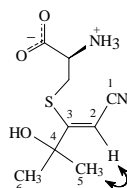


Рис. 1. Кросс-пик в спектре ЯМР 2D NOESY (^1H - ^1H) аминокислоты **2а**

Аминокислоты **2а-г** являются кинетическими продуктами и в присутствии следовых количеств NaOH (0.6 масс%) подвергаются далее типичной домино-трансформации (схема 2). По-видимому, депротонированная аминогруппа нуклеофильно присоединяется к электронодефицитной двойной связи, замыкая 1,3-тиазолидиновый цикл (интермедиат **А**), а цианогруппа, получив свободное вращение, образует с гидроксилом иминотетрагидрофурановый фрагмент в спироциклическом интермедиате **Б**. Далее следует внутримолекулярное элиминирование тиольной части молекулы, приводящее к аминокислоте с иминодигидрофурановым циклом **В**, которая затем аналогично цистеину окисляется кислородом воздуха в цистиноподобную аминокислоту в виде бисцивтер-иона **3**.

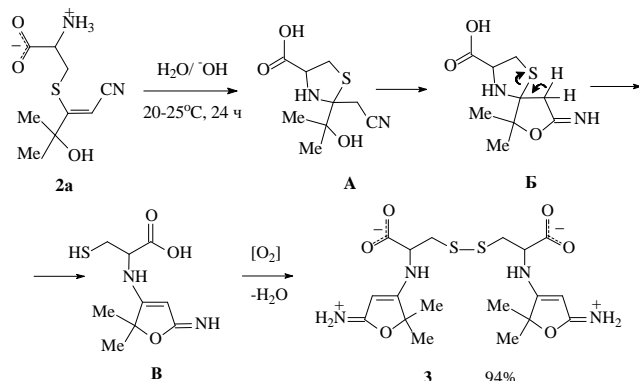


Схема 2. Перегруппировка аминокислоты **2а**

Движущей силой этой глубокой многопозиционной перегруппировки является выигрыш энергии за счет образования сопряженной 1,5-диазо-2,4-пентадиеновой системы.

Данные ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии, а также результаты ИК исследований аминокислоты **3** находятся в соответствии с ее структурой. В спектре ЯМР ^1H аддукта **3** присутствуют сигналы олефиновых протонов в области 5.07 м.д. Протоны групп CH_2 и CH образуют три дублета дублетов трехспиновой системы АВХ в области 4.10, 3.39 и 3.02 м.д. соответственно.

Цвиттер-ионная форма аминокислоты **3** подтверждается данными ИК (KBr) спектроскопии, где наблюдается широкая полоса поглощения в

области 3500-2600 cm^{-1} (с максимумами 3387, 3227, 3047, 2980, 2933 cm^{-1}), характерная для NH , $=^+\text{NH}_2$, $\text{C}=\text{CH}$, CH групп. Карбоксилат-анион проявляется широкой полосой поглощения в области 1700-1500 cm^{-1} и, очевидно, перекрывается с валентными колебаниями $\text{C}=\text{C}$ двойной связи в области 1686-1617 cm^{-1} .

Таким образом, разработан новый метод химической модификации L-цистеина, который основан на хемо-, регио- и стереоспецифичном присоединении L-цистеина к α -цианацетиленовым спиртам в мягких условиях (водная среда, комнатная температура). Синтезированные полусинтетические аминокислоты являются потенциальными фармацевтическими препаратами и перспективными строительными блоками для дизайна лекарственного средств и протеомики.

Экспериментальная часть

ИК спектры соединений зарегистрированы на спектрометре Bruker IFS-25. Спектры ЯМР ^1H (100.69 МГц) и ^{13}C (400.13 МГц) снимали на приборе Bruker DPX-400 (400 МГц).

Общая методика получения аминокислот 2а-г. К раствору L-цистеина (0.121 г, 1 ммоль) в воде (4 мл) добавляли соответствующий α -цианацетиленовый спирт **1а-г** (1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Растворитель удаляли, остаток промывали диэтиловым эфиром (5×0.5 мл), сушили в вакууме и получали аминокислоты **2а-г**.

(2R)-2-Аммоний-3-[(Z)-2-циано-1-(1-гидрокси-1-метилэтил)этинил]сульфанил]пропаноат (2а). Выход 98%; микрокристаллический порошок; Т.пл. 102-104°C; $[\alpha]_D^{25}$ -14.2 (с 0.01, H_2O).

ИК (вазелиновое масло): 3500-2500 с максимумами 3379, 3264, 3059, 2977, 2930, 2868, 2725, 2602 (OH , $^+\text{NH}_3$, $\text{C}=\text{CH}$, CH), 2209 (CN), 2064 ($^+\text{NH}_3$), 1616 (COO^-), 1580 ($\text{SC}=\text{C}$) cm^{-1} .

ЯМР ^1H (400.13 МГц, D_2O): δ = 1.36 (с, 3 H, CH_3), 1.37 (с, 3 H, CH_3), 3.45 (дд, J = 7.09, 13.69 Гц, 1 H, SCH_2), 3.63 (дд, J = 7.09, 13.69 Гц, 1 H, SCH_2), 3.94 (дд, J = 4.40, 7.09 Гц, 1 H, CH), 6.15 (с, 1 H, $=\text{CH}$) м.д.

ЯМР ^{13}C (100.62 МГц, D_2O): δ = 27.7 (CH_3), 35.9 (CH_2), 54.0 (CH), 75.2 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 100.2 ($=\text{CH}$), 117.5 (CN), 170.0 ($\text{SC}=\text{C}$), 171.5 (COO^-) м.д.

Вычислено: С, 46.94; Н, 6.13; N, 12.16; S, 13.92. $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$. Найдено: С, 46.95; Н, 6.37; N, 11.95; S, 13.63.

(2R)-2-Аммоний-3-[(Z)-2-циано-1-(1-гидрокси-1-метилпропил)этинил]сульфанил]пропаноат (2б). Выход 96%; микрокристаллический порошок; Т.пл. 129-130°C; $[\alpha]_D^{25}$ -18.7 (с 0.01, H_2O).

ИК (вазелиновое масло): 3450-2500 с максимумами 3195, 3045, 2972, 2930, 2630 (OH , $^+\text{NH}_3$, $\text{C}=\text{CH}$, CH), 2212 (CN), 2075 ($^+\text{NH}_3$), 1625 (COO^-), 1580 ($\text{SC}=\text{C}$) cm^{-1} .

ЯМР ^1H (400.13 МГц, D_2O): δ = 0.75-0.79 (м, 3 H, CH_2CH_3), 1.37, 1.38 (с, 3 H, CH_3), 1.71-1.73 (м, 2 H, CH_2CH_3), 3.50-3.72 (м, 2 H, SCH_2), 3.96-3.99 (м, 1 H, CH), 6.13 и 6.14 (с, 1 H, $=\text{CH}$) м.д.

ЯМР ^{13}C (100.62 МГц, D_2O): $\delta = 7.4$ (CH_2CH_3), 25.6, 25.7 (CH_3), 32.8, 35.8, 35.9 (CH_2), 54.1 (CH), 78.2 (CCH_3), 100.6, 100.8 ($=\text{CH}$), 117.7 (CN), 169.5 ($\text{SC}=\text{}$), 171.7 (COO^-) м.д. Удвоение всех сигналов в спектрах ЯМР объясняется образованием двух диастереомеров.

Вычислено: С, 49.16; Н, 6.60; N, 11.47; S, 13.12. $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$. Найдено: С, 48.91; Н, 6.65; N, 11.64; S, 12.98.

(2R)-2-Аммоний-3-[(Z)-2-циано-1-(1-гидроксициклопентил)этинил]сульфанил}пропаноат (2в). Выход 91%; микрокристаллический порошок; Т.пл. 156-158°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -11.5$ (с 0.01, H_2O).

ИК (вазелиновое масло): 3500-2500 с максимумами 3270, 3100, 3052, 2965, 2872, 2586 (OH , $^+\text{NH}_3$, $\text{C}=\text{CH}$, CH), 2215 (CN), 2070 ($^+\text{NH}_3$), 1616 (COO^-), 1584 ($\text{SC}=\text{C}$) cm^{-1} .

ЯМР ^1H (400.13 МГц, D_2O): $\delta = 1.64$ -1.74, 1.94 (м, 8 Н, CH_2 -циклопентил), 3.52 (дд, $J = 7.09$, 13.94 Гц, 1 Н, SCH_2), 3.65 (дд, $J = 4.40$, 13.94 Гц, 1 Н, SCH_2), 3.96 (дд, $J = 4.40$, 7.09 Гц, 1 Н, CH), 6.20 (с, 1 Н, $=\text{CH}$) м.д.

ЯМР ^{13}C (100.62 МГц, D_2O): $\delta = 23.3$, 23.4, 36.0, 38.7 (CH_2), 54.1 (CH), 85.8 (C -циклопентил), 100.8 ($=\text{CH}$), 117.6 (CN), 168.2 ($\text{SC}=\text{}$), 171.6 (COO^-) м.д.

Вычислено: С, 51.55; Н, 6.29; N, 10.93; S, 12.51. $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$. Найдено: С, 51.31; Н, 6.39; N, 10.86; S, 12.39.

(2R)-2-Аммоний-3-[(Z)-2-циано-1-(1-гидроксициклогексил)этинил]сульфанил}пропаноат (2г). Выход 94%; микрокристаллический порошок; Т.пл. 164-166°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -15.6$ (с 0.01, H_2O).

ИК (вазелиновое масло): 3520-2500 с максимумами 3277, 3056, 2936, 2858, 2595 (OH , $^+\text{NH}_3$, $\text{C}=\text{CH}$, CH), 2211 (CN), 2043 ($^+\text{NH}_3$), 1616 (COO^-), 1584 ($\text{SC}=\text{C}$) cm^{-1} .

ЯМР ^1H (400.13 МГц, D_2O): $\delta = 1.05$ -1.06, 1.40-1.46, 1.58-1.65 (м, 10 Н, CH_2 -циклогексил), 3.40 (дд, $J = 7.09$, 13.94 Гц, 1 Н, SCH_2), 3.50 (дд, $J = 4.16$, 13.94 Гц, 1 Н, SCH_2), 3.83 (дд, $J = 4.16$, 7.09 Гц, 1 Н, CH), 6.07 (с, 1 Н, $=\text{CH}$) м.д.

ЯМР ^{13}C (100.62 МГц, D_2O): $\delta = 21.1$, 24.5, 34.7, 36.2 (CH_2), 54.1 (CH), 76.7 (C -циклогексил), 101.1 ($=\text{CH}$), 117.8 (CN), 170.6 ($\text{SC}=\text{}$), 171.6 (COO^-) м.д.

Вычислено: С, 53.31; Н, 6.71; N, 10.36; S, 11.86. $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$. Найдено: С, 53.08; Н, 6.84; N, 10.28; S, 12.02.

Перегруппировка аминокислоты 2а. В 1%-ый водный раствор NaOH (4 мл) прибавляли аминокислоту 2а (1 ммоль). Реакционную смесь

перемешивали при комнатной температуре 24 ч. Воду удаляли в вакууме, полученный остаток пропускали через слой Al_2O_3 [2-3 см, элюент: 50-70 мл горячий этанол (50-60°C)]. Растворитель удаляли в вакууме и получали 2-[(5-имино-2,2-диметил-2,5-дигидро-3-фуранил)амино]-3-(2-[(5-имино-2,2-диметил-2,5-дигидро-3-фуранил)амино]-3-оксидо-3-оксопропилдисульфанил)пропаноат (3).

Выход 94%; микрокристаллический порошок; Т.пл. 192-194°C.

ИК (KBr): 3500-2500 с максимумами 3387, 3227, 3047, 2980, 2933, 2885, (OH , $^+\text{NH}_3$, $\text{C}=\text{CH}$, CH), 1686 (COO^-), 1617 ($\text{C}=\text{C}$) cm^{-1} .

ЯМР ^1H (400.13 МГц, CD_3OD): $\delta = 1.65$ и 1.63 (с, 12Н, CH_3), 3.02, 3.39 и 4.10 (дд, 6Н, CHCH_2), 5.07 (с, 2Н, $=\text{CH}$) м.д.

ЯМР ^{13}C (100.62 МГц, CD_3OD): $\delta = 24.7$ и 25.3 (CH_3), 41.06 (CH_2), 61.2 (CH), 77.5 [$\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 92.4 ($=\text{CH}$), 174.8 ($\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2$), 177.6 ($\text{HN}-\text{C}=\text{CH}$), 178.5 (COO^-) м.д.

Вычислено: С, 47.15; Н, 5.72; N, 12.22; S, 13.99. $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$. Найдено: С, 47.45; Н, 5.92; N, 12.02; S, 13.49.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам при Президенте РФ (Грант НШ-3230.2010.3), РФФИ (Грант 11-03-00203), по Интеграционным проектам Президиума РАН, ОХНМ РАН и СО РАН

Библиографический список

- 1 Niece K.L., Hartgerink J.D., Donners J.J.J.M., Stupp S.I. // *J. Am. Chem. Soc.* **2003**. Т. 125. P. 7146.
- 2 Wang X., Guo Z. // *Anti-Canc. Agents Med. Chem.* **2007**. 7. P. 19.
- 3 Ali V., Nozaki T. // *Clinical Microbiol. Rev.* **2007**. P. 164.
- 4 Riedijk M.A., Stoll B., Chacko S., Schierbeek H., Sunehag A.L., van Goudoever J.B., Burren D.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**. 104 (9). P. 3408.
- 5 Landor S.R., Demeriu B., Grzeskowiak R., Pavey D. // *J. Organometal. Chem.* **1975**. Т. 93. P. 129.
- 6 Trofimov B.A., Mal'kina A.G., Shemyakina O.A., Nosyreva V.V., Borisova A.P., Khutsishvili S.S., Krivdin L.B. // *Synthesis*. **2009**. P. 3136.
- 7 Dickstein J.I., Miller S.I. In *The Chemistry of the Carbon-Carbon Triple Bond*; Patai S., Ed.; Wiley: New York, **1978**; Part 2, p. 814.
- 8 Trofimov B.A., Mal'kina A. G. // *Heterocycles*. **1999**. 51. P. 2485.