

I. СИНТЕЗ НА АМИДИ НА АМИНОКИСЕЛИНИ И ПЕПТИДИ С 2-АМИНО-2-ФЕНИЛ-1Н-ИНДЕН-1,3(2Н)-ДИОН

Недялко Софрониев

Минно-геоложки университет „Св. Иван Рилски“, 1700 София

РЕЗЮМЕ. При аминолитизация на цветни активирани естери с 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион са получени съответните амиди на N-защитени аминокиселини и пептиди. При деблокиране на защитната N-бензилоксикарбонилна група са получени дихидробромиди на аминокиселини и пептиди съдържащи 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион. Тези водоразтворими дихидробромиди притежават антикоагулантно действие върху кръвта.

Ключови думи: 2-Амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион, цветни активирани естери: 3-О-(N-бензилоксикарбонилглицил)-2-фенил-1-инденон, 3-О-(N-бензилоксикарбонил-L-аланил)-2-фенил-1-инденон и 3-О-(N^α,N^ε-добензилоксикарбонил-L-лизил)-2-фенил-1-инденон, амиди на N-защитени аминокиселини и пептиди с 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион и техните дихидробромиди.

SYNTHESIS OF AMIDES OF AMINO ACIDS AND PEPTIDES WITH 2-AMINO-2-PHENYL-1H-INDENE-1,3(2H)-DIONE

Nedyalko Sofroniev

University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski", 1700 Sofia

ABSTRACT. By aminolysis of coloured activated esters with 2-amino-2-phenyl-1H-indene-1,3(2H)-dione respective amides of N-protected amino acids and peptides are obtained. By deblocking of protected N-benzyloxycarbonyl group dihydrobromides of amino acids and peptides containing 2-amino-2-phenyl-1H-indene-1,3(2H)-dione are obtained. These water soluble dihydrobromides possess anticoagulating activity on the blood.

Key words: 2-Amino-2-phenyl-1H-indene-1,3(2H)-dione, coloured activated esters: 3-O-(N-benzyloxycarbonyl-glycyl)-2-phenyl-1-indenone, 3-O-(N-benzyloxy-carbonyl-L-alanyl)-2-phenyl-1-indenone and 3-O-(N^α,N^ε-dibenzyloxycarbonyl-L-lysyl)-2-phenyl-1-indenone, amides of N-protected amino acids and peptides with 2-amino-2-phenyl-1H-indene-1,3(2H)-dione and their dihydrobromides.

Въведение

2-Фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион („фенилин“) и 2-β-хидроксиетил-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион („оме-фин“) са от групата на 2,2-заместените 1Н-инден-1,3(2Н)-диони и намират приложение в клиничната практика като антикоагуланти на кръвта (Машковский, 1984). Известно е, че 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дионът (H₂NPID) притежава антикоагулантно действие върху кръвта, а също така има и антивъзпалително действие (Lombardino and Wiseman, 1968). Амидът на H₂NPID с N-бензилоксикарбонилглицина (ZGly-NHPID) също притежава антикоагулантно действие върху кръвта (Sofroniev and Minchev, 2002). Други 2-амино-2-заместени 1Н-инден-1,3(2Н)-диони оказват влияние върху централната нервна система (Беленкий и др., 1960; Германе и др., 1970; Germane et al, 1978). В литературата са описани N^α-палмитоиллизинсъдържащи пептиди ацилирани с H₂NPID, които притежават антибактериална активност (Nedev et al, 1983).

Целта на настоящата работа е да се синтезират амиди на 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-диона с аминокиселини и пептиди, които да притежават антикоагулантно действие върху кръвта и да са добре разтворими във вода.

По-добрата разтворимост на тези съединения във вода може да доведе до по-добър „депоефект“, т.е. с по-малко количество от веществото да се поддържа оптималната му концентрация в кръвта за по-дълъг период от време.

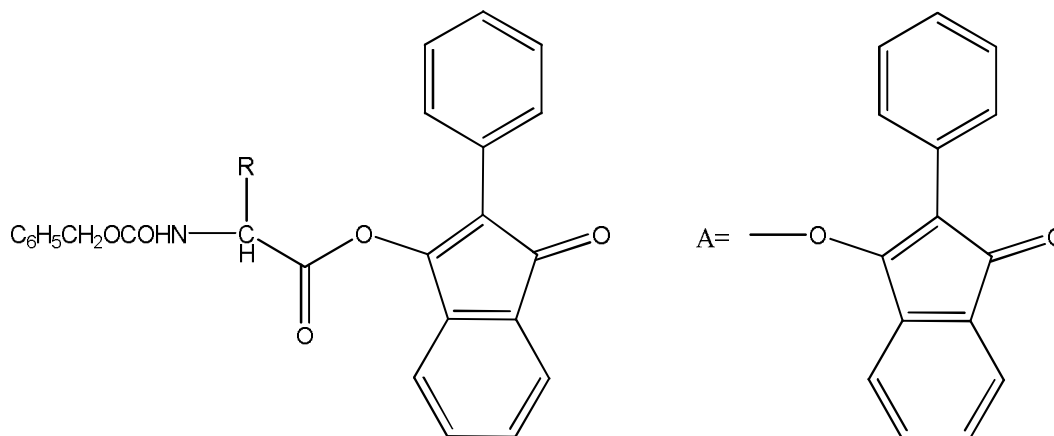
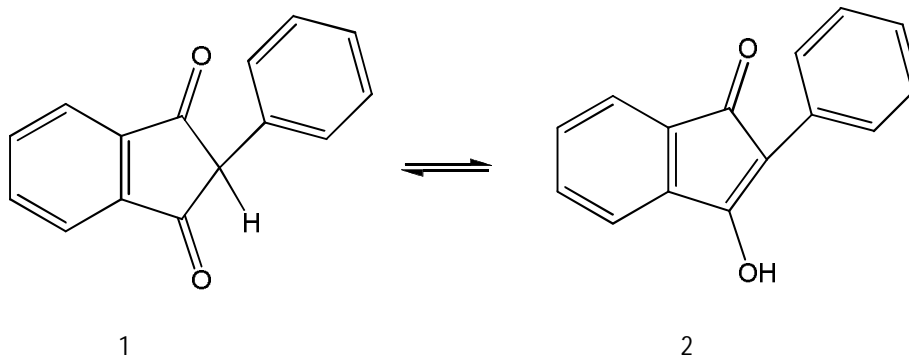
Обсъждане

„Фенилинът“ (2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион) (1) и точно неговата енолна форма 3-хидрокси-2-фенил-1-инденон (2) освен като клиничен препарат с антикоагулантно действие върху кръвта, намира приложение и като активираща компонента за получаване на цветни активирани естери, които се прилагат за синтез на пептиди (Minchev et al, 1978; Minchev, 1979; Minchev et al, 1980).

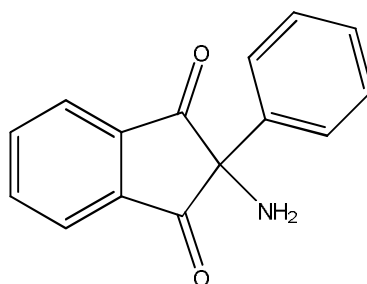
Получаването на цветните активирани естери N^α-Z-N^ε-Z-Lys-OA (3-О-(N^α,N^ε-добензилоксикарбонил-L-лизил)-2-фенил-1-инденон) (3), Z-Gly-OA (3-О-(N-бензилоксикарбонилглицил)-2-фенил-1-инденон) (7) и Z-Ala-OA (3-О-(N-бензилоксикарбонил-L-аланил)-2-фенил-1-инденон) (10) е описано в литературата. Активирани естери 3, 7 и 10 са жълтооранжево оцветени кристални съединения

(Minchev, 1979; Minchev et al, 1980). При директната аминолиза на активирания естер N^α-Z-N^ε-Z-Lys-OA 3 с H₂NPID 4 получихме с добър добив 2-N^α,N^ε-добензилоксикарбонил-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (5). Аминолизата започва веднага след смесването на етилацетатните разтвори на активирания естер и H₂NPID. Разтворът бързо добива тъмночервено оцветяване, което се дължи на отделения 3-хидрокси-2-

фенил-1-инденон (2). След изтичане на времето за аминолиза екстрахирахме неколккратно отделеният при аминолизата 3-хидрокси-2-фенил-1-инденон с 10 %-ен разтвор на натриев карбонат до избледняване на червения цвят на органичния слой. При подкисляване на водните извлеци с концентрирана солна киселина се отделя жълтооцветена утайка от 2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (1).



3: R = (CH₂)₄NHOCOCH₂C₆H₅
 7: R = H
 10: R = CH₃

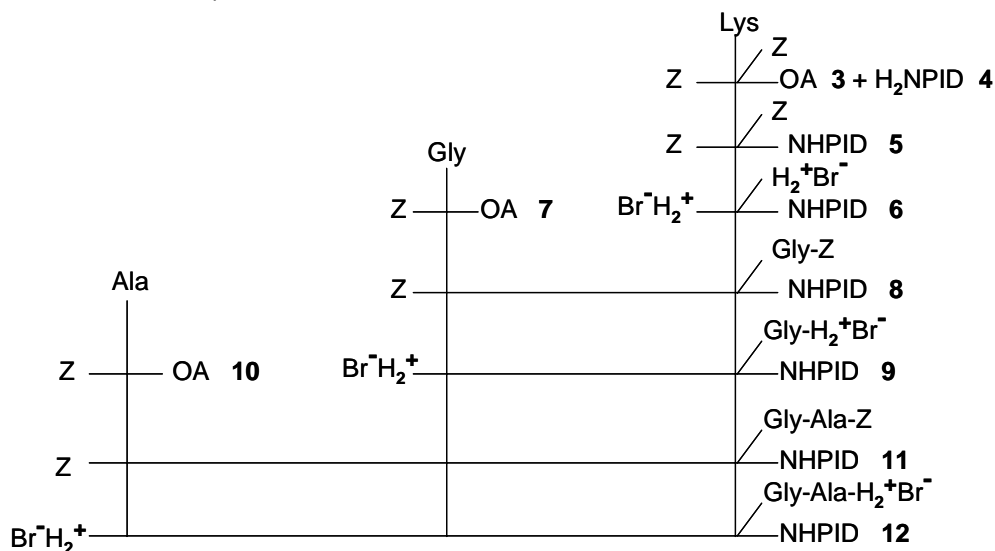


В инфрачервения спектър на съединение 5 се наблюдава сложна система от ивици на абсорбция, дължащи се на трептенията на карбонилни групи. Налице са ивици на абсорбция в областта 1750 и 1710 см⁻¹ дължащи се на симетрични и асиметрични валентни трептения на цикличните карбонилни групи от β-дикарбонилната система. В областта 1770 см⁻¹ се наблюдава и ивица на абсорбция дължаща се на валентните трептения от връзката -OC(O)NH-. Наблюдава се и ивица на абсорбция, дължаща се на валентните

трептения от amidна карбонилна група в областта 1660 – 1640 см⁻¹. Налице са и ивици на абсорбция дължащи се на валентните трептения в областта 3300 – 3100 см⁻¹ и на деформационните трептения в областта 1530 – 1510 см⁻¹ от N – H amidна връзка. При последващо деблокиране на N – бензилоксикарбонилните групи на съединение 5 с бромоводород наситен в ледена оцетна киселина (по метода на Mladenova – Orlinova et al (1967)) получихме дихидробромида на 2-N^α,N^ε-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-диона (6). Инфрачервеният спектър на

дихидробромида 6 е аналогичен със спектъра на съединение 5. Разликата в инфрачервените спектри е в това, че при съединение 6 изчезва ивицата на абсорбция при 1770 cm^{-1} дължаща се на валентните трептения от връзката $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, а се появява широка ивица на абсорбция в областта 3040 cm^{-1} дължаща се на наличието на амониева група. При аминолизата на активирания естер Z-Gly-OA 7 с дихидробромида на 2-L-N $^{\alpha}$,N $^{\epsilon}$ -лизиламино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-диона (6) и на активирания естер Z-Ala-OA 10 с дихидробромида на 2-(N $^{\alpha}$ -глицил-N $^{\epsilon}$ -глицин)-L-лизиламино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-диона (9) получихме с добри добиви N-защитените трипептид 2-(N $^{\alpha}$ -бензилоксикарбонилглицил-N $^{\epsilon}$ -бензилоксикарбонилглицин)-L-лизиламино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион (8) и пентапептид 2-(N $^{\alpha}$ -бензилоксикарбонил-L-аланилглицил-N $^{\epsilon}$ -глицилбензилоксикарбонил-L-аланин)-L-лизиламино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-

дион (11). Инфрачервените спектри на съединенията 8 и 11 са аналогични със спектъра на съединение 5. С оглед получаването на водоразтворими пептиди осъществихме деблокиране на N-бензил-оксикарбонилните защитни групи на съединенията 8 и 11 с бромоводород наситен в ледена оцетна киселина. Дихидробромидът на 2-(N $^{\alpha}$ -глицил-N $^{\epsilon}$ -глицин)-L-лизил-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-диона (9) и дихидро-бромидът на 2-(N $^{\alpha}$ -L-аланилглицил-N $^{\epsilon}$ -глицил-L-аланин)-L-лизиламино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-диона (12) изо-лирахме като твърди, но силно хигроскопични продукти, които пречистихме колоннохроматографски и съхранивахме под вакуумексикатор. Инфрачервените спектри на дихидробромидите 9 и 12 отговарят на характеристичните ивици на абсорбция наблюдавани в инфрачервения спектър на съединение 6.



От новосинтезираните хидробромиди 6, 9 и 12 за антикоагулантно действие върху кръвта бяха изследвани съединенията 6 и 9. От литературата е известно, че клиничният препарат „фенилин“ е водонеразтворим и по тази причина не се задържа продължително в живия организъм. За да се поддържа оптимална концентрация на „фенилина“ в кръвта за по-дълъг период от време, се налага приемането на големи количества от препарата като дневна доза (Машковский, 1984). Изследвана е острата токсичност на съединенията 6 и 9. Те се въвеждат перорално на безпородни бели мишки с помощта на катетър в концентрации 150, 300, 600 и 2400 мг/кг живо тегло. Към съединенията 6 и 9 се добавя физиологичен разтвор до пълното им разтваряне. При мишките третиран с клиничния препарат „фенилин“ се използват същите концентрации, но под формата на суспензия в същото количество физиологичен разтвор, както при съединения 6 и 9. Леталната доза LD₅₀ се отчита след 24 часа. LD₅₀ за съединение 6 е 835 мг/кг, а LD₅₀ за съединение 9 е 815 мг/кг, докато LD₅₀ за препарата „фенилин“ е 840 мг/кг. Антикоагулантното действие на съединенията 6 и 9 върху безпородни мишки се определя чрез измерване на времето на кръвене („Клинична лаборатория“, 1985). Веществата 6 и 9 разтворени във физиологичен разтвор се въвеждат перорално чрез катетър в доза 1/3 от LD₅₀. На 30, 90 и 180 мин след въвеждането на 6 и 9 се взема кръв след отрязване на

върха на опашката на всяка мишка. Времето на кръвене е отразено в таблицата. Антикоагулантното действие на съединенията 6 и 9 при отчитане на времето на кръвене на 30 и 90 мин е по-слабо изразено, отколкото е антикоагулантното действие на клиничния препарат „фенилин“ за същия период от време. Данните за времето на кръвене на 180 мин показват по-добро антикоагулантно действие при съединение 9 в сравнение с препарата „фенилин“. Съединението 9 като дихидробромид има добра разтворимост във вода. Това е една от причините то да се задържа по-дълго време в кръвта на опитните животни и да поддържа по-голяма концентрация в кръвта на 180 мин в сравнение с „фенилина“. При сравняване на времето на кръвене при дихидробромидите 6 и 9 е видно, че съединение 6 има по-слабо изразено антикоагулантно действие на 30, 90 и 180 мин (таблица). Съединението 6 е амид на аминокиселината L-лизин с H₂NPID, а 9 е амид на съответния трипептид с H₂NPID. Очевидно с увеличаване на броя на аминокиселините остатъци се засилва антикоагулантното действие на трипептида 9, особено при по-продължително престояване в организма (на 180 мин). Възможно е, попадайки в организма съединение 9 под действието на пептидазни ензими да претърпи разкъсване на пептидните връзки, като накрая може да остане само антикоагулантното действие на H₂NPID.

Таблица

Вещество	Доза Мг/кг	Време на кървене, мин		
		30	90	180
Контрола	0	12,3	12,1	12,4
„Фенилин“	280	15,9	17,9	19,6
Съед. 6	278	15,2	16,0	17,0
Съед. 9	271	15,6	17,7	22,4

Материали и методи

Инфрочервените спектри са снети в нуйол на спектрофотометър Carl Zeiss Specord 75 IR. Температурите на топене са определяни в открита капилляра без корекция. Органичните разтворители са изпарявани при остатъчно налягане 14 mm Hg стълб. Всички новосинтезирани съединения са охарактеризирани чрез тотален киселинен хидролиз. Получените при тоталния киселинен хидролиз аминокиселини и 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион са под формата на хидрохлориди и са идентифицирани тънкослойнохроматографски чрез детекция с нинхидринов разтвор в етанол или с йодни пари с помощта на свидетели. Чистотата на новосинтезираните съединения е контролирана с помощта на DC-Alufolien Plates, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,2 mm в следните хроматографски системи: А, етилацетат-петролев етер (1:2); Б, бензен-метанол-оцетна киселина (15:2:1); В, пиридин-п-бутанол-оцетна киселина-вода (10:15:3:12); Г, п-бутанол-пиридин-оцетна киселина-вода (20:12:3:15); Д, хлороформ-оцетна киселина (19:1); Е, п-бутанол-оцетна киселина-вода (2:1:1). Специфичните ъгли на въртене $[\alpha]_D^{20}$ на оптически активните аминокиселини са определяни с поляриметър Polamat A.

Използваните съкращения са според номенклатурата на IUPAC-IUB (IUPAC-IUB Recommendations, 1984). Допълнителни съкращения: Z = C₆H₅CH₂ОСО- (бензил-оксикарбонил), А = остатък от 3-хидрокси-2-фенил-1-инденон, NHPID = остатък от 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион.

Изходните съединения синтезирахме по описани в литературата методи: 2-Фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион (1) по Nathanson (1893) и по Godfrey and Barnes (1958), H₂NPID (2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион) (4) по Wanag and Walbe (1938) и по Sofroniev and Minchev (2002), N^α-Z-N^ε-Z-Lys-OA (3-О-(N^α,N^ε-добензилоксикарбонил-L-лизил)-2-фенил-1-инденон) (3), Z-Ala-OA (3-О-(N-бензилоксикарбонил-L-аланил)-2-фенил-1-инденон) (10) по Minchev et al (1980) и Z-Gly-OA (3-О-(N-бензилоксикарбонилглицил)-2-фенил-1-инденон) (7) по Minchev (1979).

Резултати

1. Получаване на дихидробромида на 2-(N^α-L-аланил-глицил-N^ε-глицил-L-аланин)-L-лизиламино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион

1.1. 2-N^α,N^ε-добензилоксикарбонил-L-лизиламино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион (5)

0,006 мол (1,42 г) H₂NPID 4 се разтварят в 30 мл сух етилацетат. Към получения разтвор се прибавя разтвор на 0,006 мол (3,6 г) от активирания естер N^α-Z-N^ε-Z-Lys-OA 3 в 40 мл сух етилацетат, при което реакционната среда бързо се оцветява в тъмночервен цвят. Така полученият разтвор се оставя да престои 24 часа при стайна температура. Отделеният в хода на аминолизата 3-хидрокси-2-фенил-1-инденон (2) се отстранява чрез неколккратно екстрахиране на етилацетатния разтвор с 10 %-ен разтвор на натриев бикарбонат до избледняване на цвета на органичния слой. Етилацетатният разтвор се обработва с активен въглен и се суши над безводен натриев сулфат. След това етилацетатът се изпарява до сухо при понижено налягане, остатъкът се кристализира из хлороформ/петролев етер, при което се получават светложълти кристали с т. т. 103-105°C, добив 2,62 г (69%), $[\alpha]_D^{18} = -19,9^\circ$ (с=1, етилацетат), R_f(A) = 0,31, R_f(B) = 0,82, C₃₇H₃₅N₃O₇ (633,7), изч. N: 6,63 %, нам. N: 6,82 %.

1.2. Дихидробромид на 2-N^α,N^ε-L-лизиламино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион (6)

Към 0,005 мол (3,17 г) от съединение 5 се прибавят 9 мл 40 %-ен разтвор на бромоводород в ледена оцетна киселина и реакционната колба се защитава от влагата на въздуха с хлоркалциева тръбичка. Реакционната смес се оставя да престои 40 мин при стайна температура и след това се прибавят 120 мл сух диетиллов етер при интензивно разбъркване. Течността над получената утайка се отдекантира. Остатъкът се мие няколко пъти със сух диетиллов етер, който бързо се отфилтрува и отново се мие няколко пъти със сух диетиллов етер, филтрува се и остатъкът се суши във вакуумексикатор. Безцветният дихидробромид 6 се пречиства от странични продукти чрез колонна хроматография на silica gel MN – Kieselgel 60 при използване на елуент хлороформ/ метанол (5:1). Добив 2,13 г (81 %), т.т. 148-150°C, $[\alpha]_D^{20} = -16,1^\circ$ (с=1, метанол), R_f(B) = 0,48, R_f(Г) = 0,70, C₂₁H₂₅Br₂N₃O₃ (527,2), изч. N: 7,97 %, нам. N: 8,11 %.

1.3. 2-(N^α-бензилоксикарбонилглицил-N^ε-бензилоксикарбонилглицин)-L-лизиламино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион (8)

Към 0,003 мол (1,58 г) дихидробромид 6 се прибавят 25 мл наситен разтвор на газообразен амоняк в сух хлороформ при температура 0°C. След престояване в продължение на 1 час при 0°C падналата утайка от амониев бромид се филтрува и се мие неколккратно със сух хлороформ. Обединените хлороформени извлеци се изпаряват при понижено налягане до получаването на жълт аморфен продукт, който се разтваря в 20 мл сух етилацетат. Към така получения етилацетатен разтвор се прибавят 0,006 мол (2,48 г) Z-Gly-OA 7 разтворени в 25 мл сух етилацетат. По-нататък се работи по аналогия с процедурата описана в 1.1. Съединение 8 се получава под формата на светложълт аморфен продукт с добив 1,63 г (73 %), $[\alpha]_D^{20} = -19,8^\circ$ (с=1, етилацетат), R_f(Д) = 0,41, R_f(E) = 0,80, C₄₁H₄₁N₅O₉ (747,8), изч. N: 9,36 %, нам. N: 9,15 %.

1.4. **Дихидробромид на 2-(N^α-глицил-N^ε-глицин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (9)**

Към 0,003 мол (2,24 г) от трипептида 8 се прибавят 4,5 мл 40 %-ен разтвор на бромоводород в ледена оцетна киселина и се следва процедурата описана в 1.2. Полученият безцветен дихидробромид 9 се пречиства колоннохроматографски на silica gel MN – Kieselgel 60, а като елуент се използва хлороформ/ метанол (5:1). Добив 1,63 г (85 %), т.т. 161-164°C, $[\alpha]_D^{18} = -12,7^\circ$ (с=1, метанол), R_f(B) = 0,48, R_f(Г) = 0,81, C₂₅H₃₁Br₂N₅O₅ (641,4), изч. N: 10,92 %, нам. N: 11,09 %.

1.5. **2-(N^α-бензилоксикарбонил-L-аланилглицил-N^ε-глицилбензилоксикарбонил-L-аланин)-L-лизиламино-2-фенил 1H-инден-1,3(2H)-дион (11)**

Към 0,002 мол (1, 28 г) от дихидробромида 9 се прибавят 20 мл наситен разтвор на газообразен амоняк в сух хлороформ при температура 0°C и се следва процедурата описана в 1.3. Полученият безцветен аморфен продукт се разтваря в 15 мл сух етилацетат и към разтвора се прибавят 0,004 мол (1,7 г) Z-Ala-OA 10 разтворен в 20 мл сух етилацетат. След това се следва процедурата описана в 1.1. Накрая етилацетатният разтвор се изпарява до сухо при понижено налягане, при което остава безцветния аморфен пентапептид 11 с добив 1,22 г (65 %), $[\alpha]_D^{20} = -21,0^\circ$ (с=1, етилацетат), R_f(Д) = 0,60, R_f(Е) = 0,71, C₅₁H₅₁N₇O₁₁ (938,0), изч. N: 10,45 %, нам. N: 10,12 %.

1.6. **Дихидробромид на 2-(N^α-L-аланилглицил-N^ε-глицил-L-аланин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (12)**

Към 0,001 мол (0,94 г) от пентапептида 11 се прибавят 3 мл 40 %-ен разтвор на бромоводород в ледена оцетна киселина, като се следва процедурата описана в 1.2. Новополученият безцветен дихидробромид 12 се пречиства колоннохроматографски на silica gel MN –

Kieselgel 60, а като елуент се използва хлороформ/ метанол (5:1). Добив 0,62 г (79 %), т.т. 129-132°C, $[\alpha]_D^{19} = -19,2^\circ$ (с=1, метанол), R_f(B) = 0,53, R_f(Г) = 0,81, C₃₁H₄₁Br₂N₇O₇ (783,5), изч. N: 12,41 %, нам. N: 12,22 %.

Литература

- Беленкий, М., С. Германе, А. Аренс, Г. Ванга. 1960. *ДАН СССР*, 134, 217.
- Германе, С., Ж. Озолс, А. Аренс, А. Кименис. 1970. *ХФЖ*, 25.
- “Клинична лаборатория”. 1985. София, стр. 135.
- Машковский, М. 1984. “Лекарственные средства”, Медицина, Москва, часть I, стр. 494.
- Germane, S., I. Kamjanov, A. Gilev. 1978. “Methindion”, Zinatne, Riga.
- Godfrey, J., R. Barnes. 1958 *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 3902.
- IUPAC-IUB Recommendations 1983 on “Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides.”* 1984. *Pure Appl. Chem.*, 56, 595.
- Lombardino, J., E. Wiseman. 1968. *J. Med. Chem.*, 11, 342.
- Minchev, S., N. Sofroniev, B. Aleksiev. 1978. *11th IUPAC Int. Symp. Chem. Natur. Prod.*, Varna, 3, 174.
- Minchev, S. 1979. *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, 32, 623.
- Minchev, S., I. Derdowska, G. Kupryszewski. 1980. *Pol. J. Chem.*, 54, 443.
- Mladenova-Orlinova, L., K. Blaha, J. Rudinger. 1967. *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 32, 4070.
- Nathanson, F. 1893. *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 26, 2576.
- Nedev, H., S. Minchev, S. Noneva. 1983. *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, 42, 31.
- Sofroniev, N., S. Minchev, 2002. *Bulg. Chem. Ind.*, 73, 45.
- Wanag, G., U. Walbe. 1938. *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 71, 1448.

Препоръчана за публикуване от катедра „Химия“, МТФ