

II. АМИДИ НА 2-АМИНО-2-ФЕНИЛ-1Н-ИНДЕН-1,3(2Н)-ДИОНА С ТРИПЕПТИДИ И ПЕНТАПЕПТИДИ ПРИТЕЖАВАЩИ АНТИКОАГУЛАНТНО ДЕЙСТВИЕ

Недялко Софрониев

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

РЕЗЮМЕ. Синтезирани са амиди на 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-диона с N-защитени трипептиди и пентапептиди. Дихидробромидите на тези съединения са водоразтворими и притежават антикоагулантно действие върху кръвта.

Ключови думи: 2-Амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион, цветни активирани естери на аминокиселините глицин, L-фенилаланин, L-метионин и L-аланин с 3-хидрокси-2-фенил-1-инденон, амиди на N-защитени трипептиди и пентапептиди с 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион и техните дихидробромиди.

II. AMIDES OF 2-AMINO-2-PHENYL-1H-INDENE-1,3(2H)-DIONE WITH THREEPEPTIDES AND PENTAPEPTIDES EXHIBIT ANTICOAGULATING ACTIVITY ON THE BLOOD

Nedyalko Sofroniev

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

ABSTRACT. Amides of 2-amino-2-phenyl-1H-indene-1,3(2H)-dione with N-protected threepeptides and pentapeptides are obtained. Dihydrobromides of these compounds are water soluble and possess an anticoagulating activity on the blood.

Key words: 2-Amino-2-phenyl-1H-indene-1,3(2H)-dione, coloured activated esters of amino acids glycine, L-phenylalanine, L-methionine and L-alanine with 3-hydroxy-2-phenyl-1-indenone, amides of N-protected threepeptides and pentapeptides with 2-amino-2-phenyl-1H-indene-1,3(2H)-dione and their dihydrobromides.

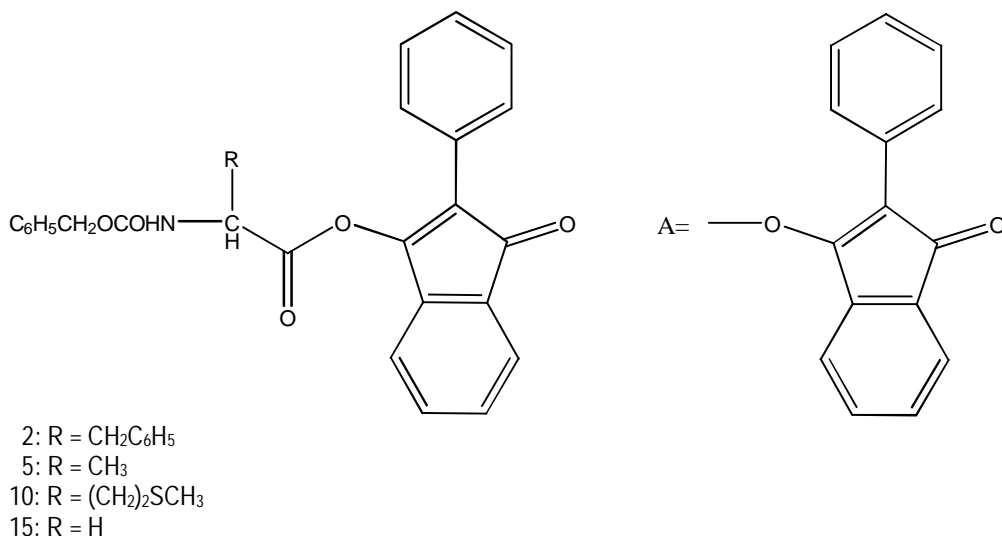
Въведение

От литературата е известно, че 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дионът (H₂NPID) е биологичноактивно вещество. Наред с антикоагулантното си действие върху кръвта, това съединение притежава и антивъзпалително действие (Lombardino and Wiseman, 1968). Амидите на H₂NPID с N-защитени аминокиселини също притежават антикоагулантно действие (Sofroniev and Minchev, 2002). При получаването на водоразтворими съединения – хидроброми-ди на амиди на H₂NPID с аминокиселини и пептиди, се наблюдава антикоагулантно действие съизмеримо и дори по-добро от антикоагулантното действие на клиничния препарат „фенилин“ (2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион) (Софрониев, 2011). Някои амиди на H₂NPID с N-палмитоиллизин-съдържащи пептиди имат ясно изразена антибактериална активност върху различни грамположителни и грамотри-цателни бактерии (Nedev et al, 1988).

Поставихме си целта да синтезираме водоразтворими амиди на H₂NPID с трипептиди и пентапептиди, които да притежават антикоагулантно действие върху кръвта и ако такова действие е налице, да установим дали промяната на аминокиселинния състав при тези съединения оказва влияние върху антикоагулантното им действие и върху продължителността на задържането им в кръвта на опитните животни.

Обсъждане

Цветните активирани естери Z-Phe-OA (3-0-(N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланил)-2-фенил-1-инденон) (2), Z-Ala-OA (3-0-(N-бензилоксикарбонил-L-аланил)-2-фенил-1-инденон) (5), Z-Met-OA (3-0-(N-бензилоксикарбонил-L-метионил)-2-фенил-1-инденон) (10) и Z-Gly-OA (3-0-(N-бензилоксикарбонилглицил)-2-фенил-1-инденон) (15) получихме по познати методи (Minchev et al, 1978; Minchev, 1979; Minchev et al, 1980).



Аминолизата на Z-Phe-OA 2 с дихидробромида на 2-N^α,N^ε-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (1) и на Z-Ala-OA 5 с дихидробромида на 2-(N^α-L-фенилаланил-N^ε-L-фенилаланин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (4) протича успешно, като се получават твърдите аморфни вещества на N-защитени три- и пентапептиди: 2-(N^α-бензилоксикарбонил-L-фенилаланил-N^ε-бензилоксикарбонил-L-фенилаланин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (3) и 2-(N^α-бензилоксикарбонил-L-аланил-L-фенилаланил-N^ε-L-фенилаланил-бензилоксикарбонил-L-аланин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (6) (схема I). По аналогичен начин протича аминолизата на активирания естер Z-Ala-OA 5 с дихидробромида на съединение 1 и на активирания естер Z-Met-OA 10 с дихидробромида на 2-(N^α-L-аланил-N^ε-L-аланин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (9), като се получават с добри добиви защитените с N-бензилоксикарбонилна група трипептид 2-(N^α-бензилоксикарбонил-L-аланил-N^ε-бензилоксикарбонил-L-аланин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (8) и пентапептид 2-(N^α-бензилоксикарбонил-L-метионил-L-аланил-N^ε-L-аланил-бензилоксикарбонил-L-метионин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (11) (схема II). А при аминолизата на Z-Met-OA 10 с дихидробромида на съединение 1 и на Z-Gly-OA 15 с дихидробромида на 2-(N^α-L-метионил-N^ε-L-метионин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (14) получихме N-защитените трипептид 2-(N^α-бензилоксикарбонил-L-метионил-N^ε-бензилоксикарбонил-L-метионин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (13) и пентапептид 2-(N^α-бензилоксикарбонилглицил-L-метионил-N^ε-L-метионил-бензилоксикарбонилглицин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (16) (схема III). Инфрачервените спектри на трипептидите 3, 8 и 13 и на пентапептидите 6, 11 и 16 са идентични. При тях е налице сложна система от ивици на абсорбция, дължащи се на трептенията на наличните карбонилни групи. Наблюдават се ивици на абсорбция в областите 1750 см⁻¹ и 1715 см⁻¹, дължащи се на симетрични и асиметрични валентни

трептения на карбонилните групи от цикличната β-дикарбонилна система. В областта 1770 см⁻¹ е налице ивица на абсорбция дължаща се на валентните трептения от връзката -OC(O)NH-, а в областта 1660-1640 см⁻¹ се наблюдава ивица на абсорбция дължаща се на валентните трептения от amidна карбонилна група. Има 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 деблокирането на N-защитните бензилоксикарбонилни групи на трипептидите 3, 8 и 13 и пентапептидите 6, 11 и 16 с бромоводород наситен в ледена оцетна киселина по Mladenova-Orlinova et al (1967) получихме дихидробромидите на трипептидите 4, 9 и 14 и на дихидробромидите на пентапептидите 2-(N^α-L-аланил-L-фенилаланил-N^ε-L-фенилаланил-L-аланин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (7), 2-(N^α-L-метионил-L-аланил-N^ε-L-аланил-L-метионин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (12) и 2-(N^α-глицил-L-метионил-N^ε-L-метионилглицин)-L-лизиламино-2-фенил-1H-инден-1,3(2H)-дион (17). Тези дихидробромиди са добре разтворими във вода и са силно хигроскопични твърди вещества, които пречистихме колоннохрома-тографски и съхранявахме във вакуумексикатор. В инфрачервените спектри на дихидробромидите на трипептидите 4, 9 и 14 и на дихидробромидите на пентапептидите 7, 12 и 17 изчезва ивицата на абсорбция при 1770 см⁻¹ дължаща се на валентните трептения от -OC(O)NH- връзката. Ако сравним инфрачервените спектри на N-защитените трипептиди 3, 8 и 13 и N-защитените пентапептиди 6, 11 и 16 с инфрачервените спектри на дихидробромидите на трипептидите 4, 9 и 14 и на дихидробромидите на пентапептидите 7, 12 и 17 ще видим, че техните спектри са идентични и се различават само по това, че при новополучените дихидробромиди изчезва ивицата на абсорбция при 1770 см⁻¹, дължаща се на валентните трептения от -OC(O)NH- връзката, а се появява широка ивица на абсорбция в областта 3040 см⁻¹ дължаща се на наличието на амониева група.

Схема I

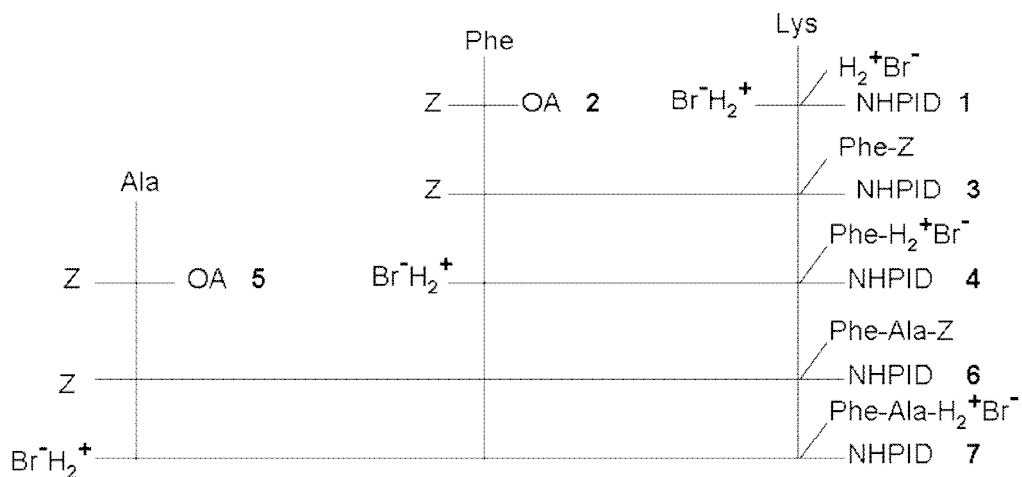


Схема II

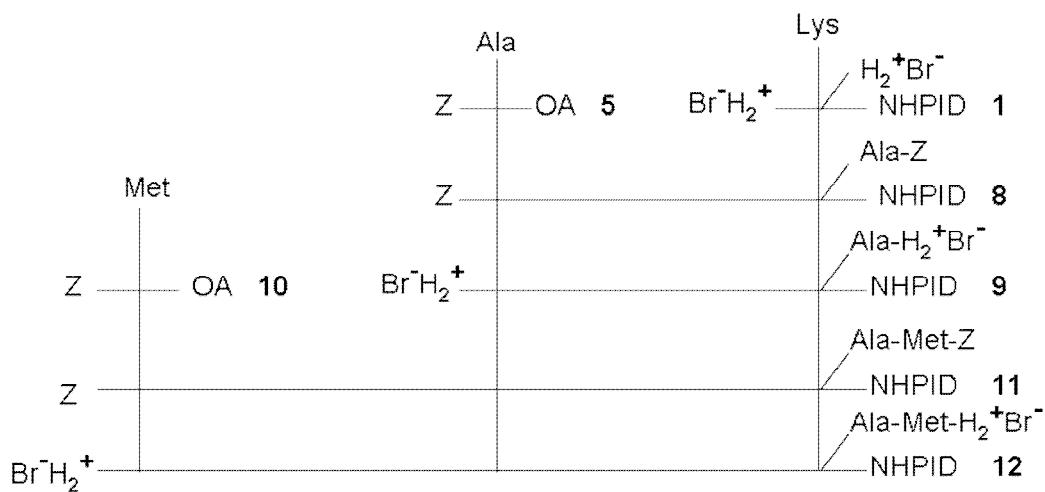


Схема III

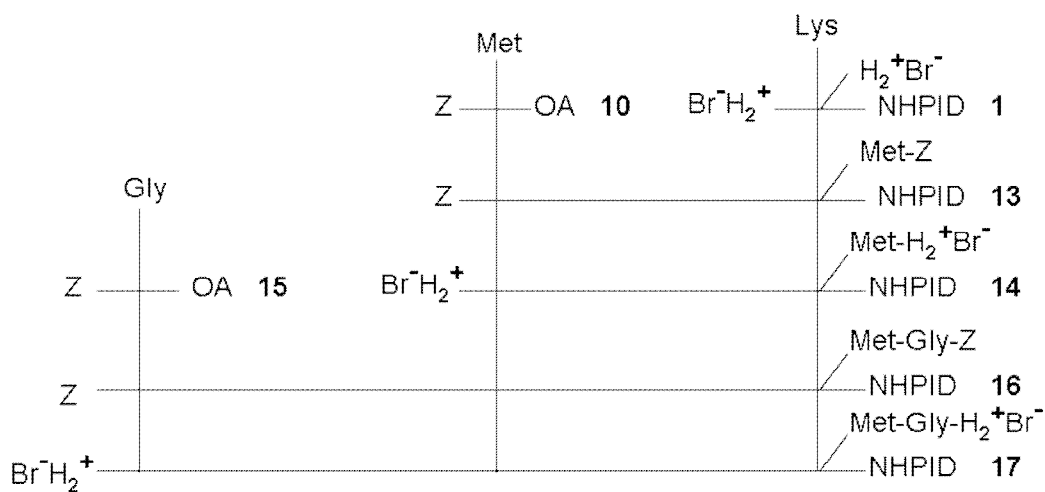


Таблица 1

№	Добив %	Анализ за N, %		R _f		[α] _D , °C (c=1, EtOAc)
		изч.	нам.			
3	71	7,55	7,53	0,33 ^A	0,77 ^B	-16,5°, 20
8	75	9,03	9,00	0,46 ^A	0,81 ^B	-11,5°, 18
13	69	7,82	7,84	0,27 ^A	0,68 ^B	-13,0°, 20
6	61	9,14	9,13	0,51 ^A	0,70 ^B	-19,0°, 19
11	60	9,44	9,41	0,40 ^A	0,81 ^B	-22,1°, 18
16	64	9,71	9,69	0,29 ^A	0,77 ^B	-20,6°, 21

Таблица 2

№	Добив %	Т. т., °C	Анализ за N, %		R _f		[α] _D , °C (c=1, MeOH)
			изч.	нам.			
4	81	173-175	8,52	8,49	0,37 ^B	0,81 ^Г	-11,7°, 21
9	79	154-157	10,46	10,47	0,24 ^B	0,70 ^Г	-17,0°, 19
14	84	139-142	8,87	8,86	0,36 ^B	0,69 ^Г	-16,3°, 18
7	76	119-121	10,17	10,15	0,41 ^B	0,80 ^Г	-19,4°, 20
12	82	124-126	10,52	10,54	0,27 ^B	0,66 ^Г	-16,8°, 20
17	80	111-114	10,85	10,83	0,31 ^B	0,78 ^Г	-18,6°, 18

От новополучените дихидробромиди на трипептиди и пентапептиди за антикоагулантно действие върху кръвта изследвахме дихидробромидите на трипептидите 4, 9 и 14. Към дихидробромидите 4, 9 и 14 добавяхме физиологичен разтвор до пълното им разтваряне. При провеждане на биологичните изпитания за сравнение използвахме клиничния препарат „фенилин“, който притежава антикоагулантно действие. От литературата е известно, че клиничният препарат „фенилин“ е водонеразтворим, поради което се налага приемането на значително количество от препарата като дневна доза (Машковский, 1984). Изследвана е острата токсичност на съединенията 4, 9 и 14 и на препарата „фенилин“. Веществата се въвеждат перорално на безпородни мишки в концентрации 150, 300, 600 и 2400 мг/ кг живо тегло. При мишките третирани с препарата „фенилин“ се прилагат същите концентрации, но под формата на суспензия в същото количество физиологичен разтвор, както при дихидробромидите 4, 9 и 14. Леталната доза LD₅₀ отчетена 24 часа след въвеждането на съединенията за съединение 4 е 820 мг/ кг, LD₅₀ за 9 е 815 мг/ кг и LD₅₀ за 14 е 825 мг/ кг, докато LD₅₀ за препарата „фенилин“ е 845 мг/ кг. Антикоагулантното действие на дихидробромидите 4, 9 и 14 и на препарата „фенилин“ определяхме чрез измерване на времето на кървене („Клинична лаборатория“, 1985). Веществата се въвеждат перорално чрез катетър в доза 1/3 от LD₅₀ и на 30, 90 и 180 мин след въвеждането им се взема кръв след отрязване на върха на опашката на всяка третирана мишка. Времето на кървене е отразено в таблица 3. В първите 30 и 90 мин антикоагулантното действие на „фенилина“ е по-добре изразено от това на дихидробромидите 4, 9 и 14, докато при 180 мин и трите дихидробромиди имат по-добро антикоагулантно действие в сравнение с това на „фенилина“. Една от причините за това действие е, че тези съединения са водоразтворими, задържат се по-продължително време в кръвта на опитните животни и поддържат по-висока концентрация в кръвта в сравнение с водонеразтворимия клиничен препарат „фенилин“. Известно е, че пептидите изграждат белтъчините в живите организми. Дихидро-бромидите 4, 9 и 14 са амиди на H₂NPID с природни трипептиди. Това сродство на дихидробромидите 4, 9 и 14 с живите

организми вероятно също е причина те да се задържат по-дълго време в кръвта и да проявяват по-добро антикоагулантно действие в сравнение с антикоагулантното действие на „фенилина“. Приблизително еднаквото антикоагулантно действие и на трите дихидробромиди 4, 9 и 14 показва, че при тези съединения различният аминокиселинен състав не оказва видимо влияние върху антикоагулантното им действие и върху продължителността на задържането им в кръвта. Попадайки в организма под действието на пептидазни ензими е възможно да се разкъсат пептидните връзки на трипептидите 4, 9 и 14, като накрая може да остане свободен H₂NPID, който да прояви антикоагулантното си действие.

Таблица 3

Вещество	Доза мг/ кг	Време на кървене, мин		
		30	90	180
Контрола	0	12,4	12,5	12,2
„Фенилин“	282	15,7	17,8	19,5
Съед. 4	273	15,1	16,9	22,3
Съед. 9	272	15,3	16,8	22,2
Съед. 14	275	15,2	16,6	22,1

Материали и методи

Температурите на топене са определяни в открита капиларна без корекция. Органичните разтворители са изпарявани при остатъчно налягане 14 мм Hg стълб. Инфрарчервените спектри са снети в нуйол на спектрофотометър Carl Zeiss Specord 75 IR. Новополучените съединения са охарактеризирани с помощта на тотален киселинен хидролиз. В резултат на киселинния хидролиз получените свободни аминокиселини и H₂NPID са под формата на хидрохлориди и са идентифицирани тънкослойнохроматографски чрез детекция с алкохол разтвор на нинхидрин или с йодни пари при наличието на свидетели. Чистотата на новосинтезираните съединения е контролирана тънкослойнохроматографски на DC Alufolien Plates, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,2 mm в следните хроматографски системи: А, хлороформ-оцетна киселина (9:1); Б, n-бутанол-оцетна киселина-вода (2:1:1); В, пиридин-n-

бутанол-оцетна киселина-вода (10:15:3:12); Г, n-бутанол-пиридин-оцетна киселина-вода (20:12:3:15). Специфичните ъгли на въртене $[\alpha]_D^t$ на оптически активните пептиди са определяни с поляриметър Polamat A. Използваните съкращения са по номенклатурата на IUPAC-IUB (IUPAC-IUB Recommendations, 1984). Използвани допълнителни съкращения: Z = C₆H₅CH₂OSO— (бензилоксикарбонил), A = остатък от 3-хидрокси-2-фенил-1-инденон, NHPID = остатък от 2-амино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-дион, EtOAc = етилацетат, MeOH = метилов алкохол.

Изходните съединения получихме по описани в литературата методи: дихидробромидът на 2-N^α,N^ε-L-лизиламино-2-фенил-1Н-инден-1,3(2Н)-диона (1) по Софрониев (2011), цветните активирани естери Z-Gly-OA (3-0-(N-бензилоксикарбонилглицил)-2-фенил-1-инденон) (15) по Minchev (1979), Z-Ala-OA (3-0-(N-бензилоксикарбонил-L-аланил)-2-фенил-1-инденон) (5), Z-Phe-OA (3-0-(N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланил)-2-фенил-1-инденон) (2) и Z-Met-OA (3-0-(N-бензилоксикарбонил-L-метионил)-2-фенил-1-инденон) (10) по Minchev et al (1980).

Резултати

1. Получаване на N-бензилоксикарбонилните производни на трипептидите 3, 8 и 13

Към 0,003 мол (1,58 г) от дихидробромида 1 се прибавят 25 мл наситен разтвор на газообразен амоняк в сух хлороформ при температура 0°C и след един час се отфильтрува падналата утайка от амониев бромид. Утайката се отфильтрува и се мие няколкократно със сух хлороформ. Обединените хлороформени извлекци се изпаряват при понижено налягане, при което се получава жълтооцветен аморфен продукт, който се разтваря в 20 мл сух етилацетат. Към получения разтвор се прибавят съответно 0,006 мол (3,02 г) Z-Phe-OA 2 или 0,006 мол (2,56 г) Z-Ala-OA 5 или 0,006 мол (2,93 г) Z-Met-OA 10 всеки от които разтворен в 25 мл сух етилацетат. Така полученият разтвор се оставя да престои едно денонощие при стайна температура. Още в началото на реакцията разтворът се оцветява в тъмночервен цвят, който се дължи на отделения в хода на аминолизата 3-хидрокси-2-фенил-1-инденон. Последният се отстранява чрез няколкократно 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. При изпаряване на етилацетата при понижено налягане до сухо, се получават съответните светложълтооцветени аморфни трипептиди 3, 8 и 13. Данните за новосинтезираните вещества са отразени в таблица 1.

2. Получаване на дихидробромидите на 4, 9 и 14

Към 0,003 мол (2,78 г) от трипептида 3 или 0,003 мол (2,33 г) от трипептида 8 или 0,003 мол (2,69 г) от трипептида 13 се прибавят 5 мл 40 %-ен разтвор на бромоводород в ледена оцетна киселина, като 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 80 мл сух диетилов етер при интензивно

разбъркване. Течността над получената утайка се отдекантирова и остатъкът се мие със сух диетилов етер. Етерът бързо се отфильтрува и получената утайка се измива няколкократно със сух диетилов етер. Получените безцветни дихидробромиди 4, 9 и 14 се сушат във вакуумексикатор. Дихидробромидите 4, 9 и 14 се пречистват чрез колонна хроматография на silica gel MN-Kieselgel 60 с елуент хлороформ/метилов алкохол (5:1). Данните за новополучените съединения са посочени в таблица 2.

3. Получаване на N-бензилоксикарбонилните производни на пентапептидите 6, 11 и 16

Към 0,002 мол от дихидробромидите на трипептидите 4 (1,64 г) или 9 (1,34 г) или 14 (1,58 г) се прибавят 20 мл наситен разтвор на газообразен амоняк в сух хлороформ при температура 0°C и по-нататък се работи както е описано в т. 1. Всеки един от получените безцветни аморфни продукти се разтваря в 15 мл сух етилацетат и към получените разтвори се прибавят разтворите на 0,004 мол (1,71 г) Z-Ala-OA 5 или 0,004 мол (1,95 г) Z-Met-OA 10 или 0,004 мол (1,65 г) Z-Gly-OA 15 в 20 мл сух етилацетат. Реакционната смес се оставя да престои едно денонощие при стайна температура. След това се следва процедурата описана в т. 1, като се получават безцветните аморфни пентапептиди 6, 11 и 16. Данните за новополучените съединения са описани в таблица 1.

4. Получаване на дихидробромидите на пентапептидите 7, 12 и 17

Към 0,001 мол от N-бензилоксикарбонилните производни на пентапептидите 6 (1,07 г) или 11 (1,04 г) или 16 (1,01 г) се прибавят 3 мл 40 %-ен разтвор на бромоводород в ледена оцетна киселина, като по-нататък се следва процедурата описана в т. 2. Новосинтезираните безцветни дихидробромиди 7, 12 и 17 се пречистват колоннохроматографски на silica gel MN-Kieselgel 60 при използване на елуент хлороформ/метилов алкохол (5:1). Данните за новополучените съединения са посочени в таблица 2.

Литература

- "Клинична лаборатория". 1985. София, стр. 135.
Машковский, М. 1984. "Лекарственные средства", Медицина, Москва, часть I, стр. 494.
Софрониев, Н. 2011. Год. МГУ, 54, св. II, с. 161.
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.
Nedev, H., S. Minchev, S. Noneva. 1983. Compt. rend. Acad. bulg. Sci., 42, 31.
Sofroniev, N., S. Minchev, 2002. Bulg. Chem. Ind., 73, 45.