



УДК 547.466;577.13

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ КОНФОРМАЦИЕЙ И АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ В РЯДУ ТОПОХИМИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ КАРНОЗИНА И КАРЦИНИНА С РАЗЛИЧНЫМИ N-АЦИЛЬНЫМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ

© 1996 г. Е. А. Рожкова, С. А. Огрель, Д. Н. Григорьев, В. Е. Небольсин,
Г. А. Желтухина[#], Р. П. Евстигнеева

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,
117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 06.03.96 г.

Чтобы выяснить влияние природы N-ацильного заместителя на антиоксидантные свойства аналогов карцинина, синтезированы соответствующие производные гистамина. Исследована антиоксидантная активность этих соединений в Fe^{2+} -аскорбатзависимой системе окисления мицеллярного раствора линолевой кислоты. Методом молекулярной механики ММ⁺ рассчитаны конформации карнозина, карцинина и их аналогов. Найдены элементы структуры и конформация, благоприятствующие проявлению антиоксидантной активности.

Ключевые слова: антиоксиданты, карнозин, карцинин, синтетические аналоги, N-ацильный заместитель, конформации.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ), включающее серию свободнорадикальных цепных реакций, – одна из основных причин нарушения структур и функций биомембран. С этим процессом связано возникновение и развитие целого ряда патологических состояний клетки [1]. Поэтому направленный поиск и изучение соединений, обладающих антиоксидантными, в том числе мембранопротекторными, свойствами, представляет научный и практический интерес.

Среди природных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, известен дипептид β Ala-His – карнозин [2, 3]. Предполагается, что его аналог гомокарнозин, представляющий собой γ Abu-His, также является антиоксидантом [4]. Кроме того, недавно была обнаружена антиоксидантная активность декарбоксилированного аналога карнозина – β Ala-NA (карцинина) [2, 3]. Известно, что карнозин и карцинин метаболически связаны с гистамином [5], который в свою очередь способен модулировать процесс ПОЛ [3, 6], проявляя таким образом неспецифическую, рецепторную активность.

Одним из общепринятых подходов к проблеме взаимосвязи структуры и функции биологически активных пептидов является изучение их топохимических аналогов. Такие соединения можно получить путем замены аминокислотных остатков природных пептидов, циклизации линейных пептидов, синтеза гибридных молекул, сочетающих в себе элементы структур природных пептидов [7].

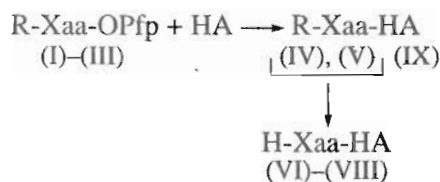
К настоящему времени осуществлен синтез ряда аналогов карнозина, в которых варьировались N-ацильные заместители по гистидиновому остатку. Среди них обнаружены соединения, обладающие более высокой антиоксидантной активностью, чем карнозин [8, 9]. Примеры таких аналогов (XIII)–(XV) приведены в табл. 1.

Целью настоящей работы было изучение влияния замены N-ацильного заместителя в топохимических аналогах карнозина и карцинина на конформацию и взаимосвязь конформации с антиоксидантными свойствами. Для этого нами осуществлен синтез карцинина и его аналогов, представляющих собой производные гистамина, ацилированные по аминогруппе остатками аминокислот и жирных кислот [10, 11] общей формулы Хаа-NA, где Хаа = β Ala, γ Abu, Glp, Lau.

В частности, мы получили декарбоксилированный аналог гомокарнозина, имеющий строение γ Abu-NA. Топохимические аналоги карцинина, содержащие остатки пироглутаминовой или жирной кислот, характеризуются отсутствием

Сокращения: β Ala – β -аланин, γ Abu – γ -аминоасляная кислота, Im – имидазол, Lau – лауриновая кислота, Dec – декановая кислота, Glp – пироглутаминовая кислота, NA – гистамин, Pfp – пентафторфенил, ПОЛ – перекисное окисление липидов.

[#] Автор для переписки.



Соединение	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)*	(VII)	(VIII)	(IX)
Xaa	β Ala	γ Abu	Glp	β Ala	γ Abu	β Ala	β Ala	γ Abu	Glp
R	Вос	Вос	H	Вос	Вос	H	H	H	H

* Дихлоргидрат.

Схема 1.

такого элемента структуры, как первичная аминогруппа. Циклический пироглутаминовый остаток содержит вторичную NH-группу в составе имида. Можно ожидать, что липофильное соединение (X), в котором остаток β Ala карцинина заменен на остаток лауриновой кислоты, будет обладать повышенным сродством к липидной мембране и усиленными протекторными свойствами в отношении ПОЛ.

Синтез аналогов осуществляли классическими методами пептидной химии с применением активированных пентафторфениловых эфиров как наиболее активных из известных [12] по схеме 1. Аминофункцию аминокислот защищали *tert*-бутилоксикарбонильной группой. Пироглутаминовую кислоту использовали в синтезе без защиты аминофункции.

Не описанные ранее пентафторфениловые эфиры (I)–(III) были получены с использованием известных методик [13] в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида. Строение соединений (I), (II) подтверждено данными ИК-спектроскопии и элементного анализа, активированный эфир (III) использовали без выделения.

В связи с плохой растворимостью гистамина аминолиз с его помощью проводился в среде безводного DMF. Реакции протекали достаточно быстро (в течение суток). Вос-Защищенные соединения (IV) и (V) были получены в кристаллическом виде и с высокими выходами (до 90%). На стадии снятия Вос-защиты действием хлористого водорода в метаноле промежуточный дихлоргидрат β -аланилгистамина (VI) очищали на колонке с анионитом АРА-8п (Cl⁻-форма).

Очистку и выделение конечных продуктов (VII)–(IX) проводили в одну стадию путем пропускания через анионообменник АРА-10п (или 8п) в OH⁻-форме с элюцией водным спиртом, например 60% метанолом или 70% этанолом. Получали устойчивые кристаллические свободные основания (VII)–(IX) с выходом 40% для соединения (VII) и около 90% для (VIII) и (IX).

Синтез N-лауроилгистамина (X) осуществлялся обычным методом ацилирования по аминогруппе с помощью хлорангидрида лауриновой кислоты в безводном DMF в присутствии основания. Вследствие практически количественного протекания реакции очистка целевого продукта была упрощена

Таблица 1. Параметры конформаций соединений, родственных карнозину (XI) и карцинину (VII)

Соединение	Структура	Потенциальная энергия, ккал/моль		Длины водородных связей, Å, между		
		свернутой конформации	полусвернутой конформации	NH ^m и CO амидной связи	NH ₂ и CO амидной связи	NH ^m и COOH-группы
(XI)	β Ala-His	-4.6	-3.5	–	–	2.76
(XII)	γ Abu-His	-3.3	-2.4	2.71	2.9	–
(XIII)	Pro-His	3.1	4.5	–	–	2.4
(XIV)	Dec- β Ala-His	-1.1	0.4	–	–	2.71
(XV)	Dec-His	1.2	2.3	–	–	2.7
(VII)	β Ala-HA	0.03	0.7	2.65	3.41	–
(VIII)	γ Abu-HA	1.4	1.6	2.51	2.76	–
(X)	Lau-HA	6.5	7.4	2.49	–	–
(IX)	Glp-HA	1.6	1.3	2.67	–	–

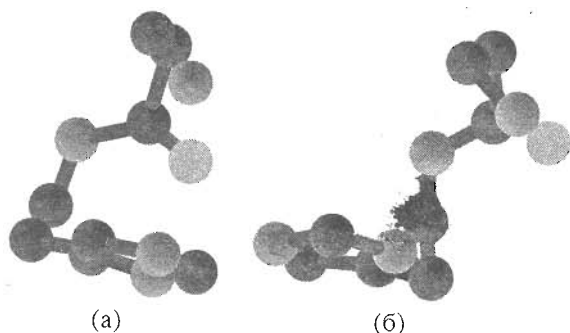


Рис. 1. Расчетные структуры карцинина: свернутая (а) и полусвернутая (б).

и проводилась без применения метода колоночной хроматографии. Соединение (X) получили с выходом около 70%.

Соединения (IV)–(X) охарактеризованы методами ИК-, ^1H -ЯМР-спектроскопии, элементарным анализом, а индивидуальность подтверждена методом ВЭЖХ.

Полученные нами соединения (VII)–(X) были исследованы в концентрациях 10^{-2} – 10^{-3} в Fe^{2+} -аскорбатзависимой модельной системе окисления мицеллярного раствора полиненасыщенной жирной кислоты, что дает возможность определить прямой антиоксидантный эффект при взаимодействии производных гистамина и субстрата ПОЛ. Антиоксидантную активность определяли путем измерения уровня малонового диальдегида по реакции с тиобарбитуровой кислотой через 35 мин после инициации окисления [3]. Экспериментальные данные (табл. 2) демонстрируют эффект, максимально достижимый для каждого соединения в интервале концентраций 10^{-2} – 10^{-3} М. Все предложенные нами аналоги карцинина проявили антиоксидантную активность, причем степень ингибирования окисления полиненасыщенной жирной кислоты колебалась в интервале 19–70%.

Таблица 2. Влияние N-ацильных производных гистамина на Fe^{2+} -аскорбатзависимое окисление линолевой кислоты

Соединение	Концентрация, мМ	Ингибирование ПОЛ*, %	Ссылка
Lau-NA (X)	1	70	–
β Ala-His (XI)	25	59	1, 2
β Ala-NA (VII)	25	47	1, 2
γ Abu-NA (VIII)	20	20	–
Glp-NA (IX)	20	19	–
Гистамин	25	–32	2

* Измерено через 35 мин после инициации окисления относительно контроля (в отсутствие исследуемых соединений).

Для определения зависимости между антиоксидантной активностью и строением исследуемых соединений был проведен конформационный расчет на компьютере IBM PC 486 DX2 по программе Hyper Chem (Release 3 for Windows. Molecular Modelling System. Hypercube, Inc. and Autodesk, 1993) методом молекулярной механики ММ⁺ для условий вакуума. Оптимизирующая функция рассчитывала энергетический минимум молекулы, варьируя длины связей, валентные углы, торсионные углы и при этом учитывала ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Грубая геометрическая оптимизация осуществлялась по Steepest Descent, а более тонкая – по Polak-Ribiere (сопряженно-градиентному алгоритму). Критериями остановки расчета было достижение предела количества итераций (1000) и достижение градиента энергии, меньшего, чем квадрат величины порога, т.е. 0.0001 (с тем чтобы энергия после очередной итерации изменялась меньше, чем на 0.01 ккал/моль). Для поиска у молекул глобальных минимумов энергии применялись различные стратегии перебора конформеров. В результате поиска глобальных минимумов энергии молекул были найдены по два конформера для каждого соединения из исследуемого ряда. Эти конформеры различались между собой значениями энергии и степенью свернутости молекулы (табл. 1). Несмотря на близкие геометрические характеристики конформеров внутри исследуемого молекулярного ряда, устойчивость этих конформеров для разных молекул неодинакова (табл. 1). На основании рассмотрения энергетических параметров и длин водородных связей предсказанных конформеров можно заключить, что наличие водородной связи между атомом водорода имидазола и карбонильным атомом кислорода пептидной связи или карбоксильной группы способствует устойчивости свернутой конформации. В то же время усиление водородной связи между атомом водорода аминогруппы и атомом кислорода в пептидной связи, очевидно, может стабилизировать полусвернутую конформацию. На рис. 1 представлена молекула карцинина в предсказанных свернутой и полусвернутой конформациях.

Полученные результаты находятся в соответствии с теоретическими данными об актуальности свернутой или квазициклической конформации для осуществления многими биологически активными пептидами своих функций [7]. Что касается антиоксидантов пептидной природы, подтверждение этой посылки содержится в работе Ю.П. Швачкина [8], где в ряде случаев продемонстрирована более высокая антиоксидантная активность циклических аналогов карнозина по сравнению с соответствующими линейными предшественниками.

Анализ параметров конформаций, представленных в табл. 1, проводился нами отдельно для

двух групп соединений: производных гистидина (XI)–(XV) и гистамина (VII)–(X).

Описанные ранее Pro-His (XIII) и N-Dec-карнозин (XIV) [8, 9] имеют наибольшее различие в значениях минимальных энергий свернутой и полусвернутой конформаций (соответственно 1.4 и 1.5 ккал/моль).

Для β Ala-His (XI) и N-Dec-His (XV) отличия в энергиях свернутой и полусвернутой конформаций одинаковы (1.1 ккал/моль).

У γ Abu-His (XII) разница в значениях упомянутых энергий наименьшая среди His-содержащих соединений – 0.9 ккал/моль.

Для всех рассмотренных соединений – (XIII), (XI), (XIV), (XV), за исключением гомокарнозина (XII), свернутая конформация молекулы стабилизируется водородной связью между атомом водорода при вторичном азоте имидазола и карбонильным кислородом карбоксильной группы остатка гистидина. В наибольшей степени это проявляется у Pro-содержащего аналога карнозина, для которого предсказана наименьшая длина этой водородной связи (2.4 Å). Для соединений (XI), (XIV), (XV) длина рассматриваемой связи имеет близкие значения, хотя в липофильных производных карнозина и гистидина она все же несколько короче, чем в самом карнозине.

Реализации свернутой конформации соединений (XIII), (XI), (XIV), (XV) не может помешать возможная водородная связь между атомом водорода аминогруппы и атомом кислорода пептидной связи.

В случае гомокарнозина (XII), несмотря на наличие предсказанной нами водородной связи между атомом водорода имидазола и атомом кислорода пептидной связи, поддерживающей свернутую конформацию, устойчивость последней снижена из-за присутствия водородной связи между атомом водорода аминогруппы и атомом кислорода пептидной связи.

Таким образом, в ряду His-содержащих соединений свернутая конформация наиболее предпочтительна для соединений (XIII) (Pro-His) и (XIV) (Dec- β Ala-His), далее по степени убывания – соединения (XV) (Dec-His) и (XI) (β Ala-His). Для гомокарнозина свернутая конформация наименее вероятна.

Полученные данные по конформационному строению молекул коррелируют с антиоксидантной активностью карнозина и его аналогов. Если незамещенный гистидин слабо стимулирует ПОЛ [3, 6], то его N-ацильные производные ингибируют этот процесс [8]. Так, обнаружена высокая антиоксидантная активность Pro-содержащего аналога карнозина (XIII) в модельной реакции окисления мембран саркоплазматического ретикула из мышц кролика в системе Fe^{2+} – аскорбат [8]. В составе липосом и в водной фазе липосомаль-

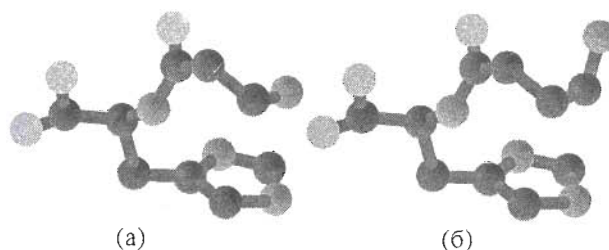


Рис. 2. Расчетные свернутые структуры карнозина (а) и гомокарнозина (б).

ной суспензии низкие концентрации карнозина не проявили заметного антиоксидантного эффекта в отличие от N-ацильных липофильных производных карнозина и гистидина [9]. Гомокарнозин (XII) в концентрациях 1 – 12 мМ не оказывал ингибирующего действия на процесс перекисного окисления микросом печени крысы, индуцированного ионами железа и аскорбиновой кислотой [14]. Необходимо отметить, что строгое сравнение абсолютных величин антиоксидантного эффекта соединений (XI), (XIII) – (XV) не представляется возможным из-за существенных различий в условиях проведения эксперимента.

Согласно нашим конформационным расчетам, для осуществления свернутой конформации важен именно карбонильный, но не гидроксильный кислород карбоксильной группы. Действительно, ранее было отмечено отсутствие влияния амидирования карбоксильной группы на антиоксидантные свойства аналогов карнозина [8].

В результате аналогичного рассмотрения гистаминсодержащих соединений ряда карцинина (VII)–(X) по вероятности осуществления свернутой конформации их можно расположить в следующий ряд (в порядке возрастания энергии, т.е. убывания вероятности): (X) > (VII) > (VIII) > (IX). При этом соединение (X) характеризуется и наименьшей длиной водородной связи между водородом имидазольного цикла и кислородом амидной связи, стабилизирующей свернутую конформацию. Кроме того, соединение (X) является единственным в ряду исследуемых гистаминсодержащих соединений, для которого не обнаружено каких-либо ослабляющих эту конформацию факторов.

Остальные аналоги карцинина, за исключением (IX), характеризуются наличием как стабилизирующих свернутую конформацию связей между водородным атомом имидазольного цикла и атомом кислорода амидной связи, так и дестабилизирующей водородной связи между концевой NH_2 -группой и CO амида. Если для соединения (VIII) вероятность осуществления обеих этих связей приблизительно одинакова, то для карцинина (VII) связь второго типа существенно менее вероятна.

В производном пироглутаминовой кислоты (IX) длина стабилизирующей свернутую конформацию связи приблизительно равна таковой в карциnine. И так же, как у последнего, конформация соединения (IX) в незначительной степени ослабляется водородной связью 3.13 Å между атомом водорода NH пептидной связи и атомом кислорода амидной связи из остатка пироглутаминовой кислоты. Необходимо отметить, что Glp-NA (IX) – единственное соединение исследуемого ряда, у которого энергетическая выгодность свернутой конформации оказалась даже ниже, чем полусвернутой.

Суммируя вышесказанное в отношении производных гистамина, можно расположить их в следующий ряд по убыванию вероятности нахождения их в свернутой конформации: (X) > (VII) > > (VIII) ≥ (IX).

Закономерности, обнаруженные при расчете конформаций производных гистамина, коррелируют с данными измерений антиоксидантной активности этих соединений, проведенных нами в одинаковых условиях [3] в интервале концентраций 10^{-2} – 10^{-3} М (табл. 2). Наилучшими конформационными характеристиками, благоприятствующими проявлению антиоксидантного эффекта, обладает N-лауроилгистамин (X), для которого обнаружен максимальный антиоксидантный эффект.

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что наличие N-ацильного заместителя в исследованном ряду производных гистамина обуславливает проявление у них антиоксидантного эффекта в отличие от незамещенного гистамина, который является прооксидантом [3, 6] в рассматриваемом интервале концентраций (табл. 2). Недавно было показано, что N-ацетилгистамин и аналоги гистамина, представляющие собой имидазол и его производные, проявляют существенно меньший прооксидантный эффект или практически не влияют на Fe^{2+} -аскорбатзависимое окисление полиненасыщенной жирной кислоты [6]. На основании этого было высказано предположение, что первичная аминогруппа гистамина существенно важна для проявления им прооксидантной активности [6].

Среди аминокислотных заместителей как гистидина, так и гистамина (карнозин и карцинин) наиболее благоприятным для осуществления свернутой конформации, судя по полученным нами данным, является остаток β-аланина. В этом случае дестабилизирующая связь между N-концевой аминогруппой и кислородом амидной связи отсутствует или маловероятна. Удлинение аминокислотного остатка на одну CH_2 -группу при сохранении N-концевой первичной аминогруппы (производные

γAbu и His, NA) приводит к повышению вероятности появления упомянутой дестабилизирующей связи, что не благоприятствует осуществлению свернутой конформации. Необходимо отметить, что предположение о существовании “некой критической конформации” карнозина, обеспечивающей его антиоксидантную активность и отличающейся от таковой у гомокарнозина, было высказано в 1989 г. [14].

Замещение первичной аминогруппы в гистидинсодержащих дипептидах (XIII), (XIV) или удаление этой группы как структурного элемента из молекулы His- (NA-) содержащего дипептида (псевдодипептида) (X), (XV) устраняют причину появления дестабилизирующей водородной связи. Например, пролиновый аналог, N-ацильный заместитель которого содержит циклическую алифатическую структуру с вторичной аминогруппой, обладает значительным антиоксидантным потенциалом [8].

Необходимо отметить, что появление в подобной структуре полярного заместителя, например карбонильного кислорода в пироглутаминовом производном (IX), существенным образом изменяет конформацию молекулы и значительно снижает его антиоксидантные свойства.

Рациональным представляется использование в качестве N-ацильного заместителя остатка жирной кислоты (в рассмотренных нами примерах C_{10} – C_{12}), которые кроме отсутствия аминогруппы характеризуются повышенной липофильностью. Это позволяет прогнозировать усиление сродства к бислойной мембране и, как следствие, повышение концентрации антиоксиданта в среде, где и протекает ПОЛ. Необходимо отметить, что предложенное нами соединение (X) обладает повышенной антиоксидантной активностью и в водно-органической среде. Кроме вышесказанного весьма ценным представляется растворимость этого соединения как в органической, так и в водной средах в отличие от водорастворимых карнозина, карцинина и природных жирорастворимых антиоксидантов, например α-токоферола.

Таким образом, основным результатом проведенного исследования является интерпретация влияния N-ацильного заместителя в составе карнозина, карцинина и их аналогов на основании параметров конформаций соединений, полученных путем компьютерного расчета. Можно предположить, что свернутая конформация благоприятствует проявлению антиоксидантного эффекта в рассмотренном ряду соединений. Представляется, что удаление первичной аминогруппы и повышение липофильности N-ацильного заместителя может служить одним из основных приемов при конструировании имидазолсодержащих антиоксидантов с более высокой активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались пироглутаминовая кислота (Aldrich, США); β -аланин, γ -аминомасляная кислота (Reanal, Венгрия); гистамин, пентафторфенол (Fluka, Швейцария); линолевая кислота (Sigma, США); анионообменники АРА-10п и 8п с четвертичными аммониевыми группами (НПО "Биолар", Латвия).

^1H -ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) и Varian XL-400 (Япония) в дейтерированном метаноле. Приведены химические сдвиги (δ , м. д.) относительно тетраметилсилана. ИК-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония) в вазелиновом масле. Температуру плавления измеряли на приборе Voetius (ФРГ), углы оптического вращения – на спектрополяриметре Perkin-Elmer MC-241M (Великобритания) и спектрополяриметре Y-20 (Япония). Элементный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Heraeus CHNO-Rapid (ФРГ).

Индивидуальность полученных соединений проверяли методом ТСХ на пластинках Alufol (нейтральные, ФРГ) в метаноле (А), на пластинках Silufol UV-254 (Чехо-Словакия) в системах: метанол (Б), изопропанол–вода–25% аммиак, 6 : 1 : 3 (В), хлороформ–метанол–25% аммиак, 5 : 3 : 1 (Г), бутанол–уксусная кислота–вода, 8 : 3 : 2 (Д), изопропанол–хлороформ–толуол, 1 : 3 : 5 (Е), хлороформ–метанол, 9:1 (Ж), хлороформ–метанол, 95 : 5 (З). Хроматограммы проявляли хлор-толидиновым реактивом, нингидрином и с помощью свечения в УФ-свете.

Аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили в условиях: 1) колонка Separon C-18 (3.0 × 250 мм), элюция 0.1 М раствором Na_2HPO_4 (рН 2.7, доведение H_3PO_4), скорость элюирования 0.2 мл/мин; 2) то же, но рН 2.4; 3) колонка Silasorb C-18 (4.0 × 125 мм), элюция 70% ацетонитрилом в 0.05% растворе гептафтормасляной кислоты в воде.

Окисление эмульсии линолевой кислоты (0.25 мг/мл) в 0.1 М трис-НСl-буфере (рН 7.4) инициировали добавлением 2.5 мкМ FeSO_4 и 200 мкМ аскорбиновой кислоты и инкубировали 35 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением охлажденного 0.25 М водного раствора НСl, содержащего 15% трихлоруксусной кислоты. Концентрацию малонового диальдегида определяли реакцией с 0.125% тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Уровень ТБК-реактивных продуктов регистрировали спектрофотометрически при 535 нм [2, 3].

N-трет-Бутилоксикарбонильные производные β -аланина и γ -аминомасляной кислот получали по стандартной методике [10].

Пентафторфениловый эфир *N*-трет-бутилоксикарбонил- β -аланина. К раствору 1.0 г (5.0 ммоль) Вос- β Ala-ОН и 0.09 г (5.0 ммоль) пентафторфенола в 5 мл безводного этилацетата при -10°C и интенсивном перемешивании прибавляли 0.11 г (5.1 ммоль) $\text{N,N}'$ -дициклогексилкарбодиимида. После перемешивания в течение 3 ч при -10°C реакционную массу выдерживали 48 ч при 0°C . Осадок дициклогексилмочевины отделяли. Растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили над P_2O_5 . Выход белого кристаллического вещества (I) 1.83 г (97%), т. пл. $51\text{--}54^\circ\text{C}$, R_f 0.87 (В). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1778 (сл. эфир), 1680 (Амид I), 1510 (Амид II), 1140 (Aryl-F). Найдено, %: С 47.82; Н 4.14; N 4.23. $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{F}_5$. Вычислено, %: С 47.35; Н 3.94; N 3.94.

***N*-трет-Бутилоксикарбонил- β -аланилгистамин (IV).** К раствору 1.75 г (4.9 ммоль) Вос- β Ala-OPfr (I) в 4 мл безводного DMF прибавляли 0.60 г (5.0 ммоль) гистамина и перемешивали 0.5 ч при 20°C и 24 ч при 0°C . Растворитель удаляли в глубоком вакууме. Маслообразный остаток пересаждали из 1.5 мл метанола 2 мл эфира. Выпавшие кристаллы отделяли декантированием. Растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили над P_2O_5 . Выход желтоватого кристаллического вещества (IV) 1.38 г (86%), т. пл. $137\text{--}140^\circ\text{C}$, R_f 0.78 (Б). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 3300 (NH), 1650 (Амид I), 1560 (Амид II). ^1H -ЯМР-спектр: 1.65 (с, 9H, Вос), 2.52 (т, 2H, β -CH₂, β Ala), 2.97 (т, 2H, β -CH₂, HA), 3.47 (т, 2H, α -CH₂, HA), 3.62 (т, 2H, α -CH₂), 7.10 (с, 1H, CH-5, Im), 7.95 (с, 1H, CH-2, Im).

β -Аланилгистамин, дихлоргидрат (VI). К 0.96 г (2.13 ммоль) Вос- β Ala-НА (IV) добавляли 5.0 мл 3 н. НСl в безводном метаноле и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме, остаток промывали безводным диэтиловым эфиром, сушили в вакууме над P_2O_5 . Получали 0.77 г (89.5%) маслообразного продукта. Очищали на колонке с анионитом АРА-8п (Cl⁻-форма), элюируя 60% водным метанолом. Объединяли фракции с R_f 0.3 (В). Растворитель удаляли в вакууме. Маслообразный остаток лиофилизировали. Сушили в вакууме над P_2O_5 . Выход аморфного стекловидного вещества (VI) желтого цвета 0.47 г (61%), т. пл. $181\text{--}183^\circ\text{C}$, R_f 0.3 (В), 0.56 (А). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1660 (Амид I), 1560 (Амид II). Найдено, %: С 37.71; Н 6.33; N 21.16; Cl 26.39. $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O} \cdot 2\text{HCl} \cdot 1/3\text{CH}_3\text{NO}$. Вычислено, %: С 37.63; Н 6.52; N 21.08; Cl 26.69.

β -Аланилгистамин (VII). На колонку с анионитом АРА-8п (ОН⁻-форма) наносили 0.47 г β Ala-НА · 2НСl (VI) и элюировали 60% водным метанолом. Объединяли фракции с R_f 0.34 (В). Растворитель удаляли в вакууме, остаток лиофилизировали. Сушили в вакууме над P_2O_5 . Получали кристаллическое вещество в количестве 0.14 г (43.3%), т. пл.

115–117°C, R_f 0.34 (В), 0.11 (А). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1650 (Амид I), 1570 (Амид II). ^1H -ЯМР-спектр: 2.34 (т, 2H, β - CH_2 , βAla), 2.87 (т, 2H, β - CH_2 , НА), 3.30 (т, 2H, α - CH_2 , НА), 3.45 (т, 2H, α - CH_2 , βAla), 6.85 (с, 1H, СН-5, Im), 7.60 (с, 1H, СН-2, Im). Найдено, %: С 51.26; Н 7.70; N 28.31. $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O} \cdot 1/2\text{CH}_3\text{OH}$. Вычислено, %: С 51.49; Н 8.07; N 28.26. ВЭЖХ в условиях (3): время выхода индивидуального пика 14.9 мин.

Пентафторфениловый эфир *N*-трет-бутилоксикарбонил- γ -аминомасляной кислоты (II). К раствору 2.81 г (13.83 ммоль) Вос- $\gamma\text{Abu-OH}$ и 2.55 г (13.85 ммоль) пентафторфенола в 15 мл безводного этилацетата при -10°C и перемешивании прибавляли 3.13 г (15.21 ммоль) $\text{N,N}'$ -дициклокарбодиимида. После перемешивания в течение 1.5 ч при -10°C реакционную массу выдерживали 12 ч при 0°C . ТСХ осуществляли в условиях (Е), R_f 0.69. Осадок дициклогексилмочевины отделяли. Фильтрат концентрировали и оставляли на 12 ч при 0°C . Выпавшие кристаллы отделяли фильтрованием, сушили в вакууме над P_2O_5 . Получали белое кристаллическое вещество в количестве 3.35 г (69%), т. пл. 65–67°C, R_f 0.69 (Е), 0.72 (Ж). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1807 (сл. эфир), 1697 (Амид I), 1526 (Амид II), 1120 (Aryl-F). Найдено, %: С 48.95; Н 4.22; N 3.75. $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NF}_5\text{O}_4$. Вычислено, %: С 48.74; Н 4.37; N 3.79.

***N*-трет-Бутилоксикарбонил- γ -аминобутирилгистамин (V).** К 1.80 г (4.65 ммоль) Вос- $\gamma\text{Abu-OPf}$ (II) прибавляли раствор 0.52 г (4.65 ммоль) гистамина в 20 мл безводного диметилформамида. Перемешивали 1 ч при 20°C . Оставляли на 24 ч при 0°C . Растворитель удаляли в глубоком вакууме. Маслообразный остаток кристаллизовали из смеси пентана и эфира (10 : 12 мл). Выдерживали 24 ч при 0°C . Растворители отделяли декантированием. Остаток сушили в вакууме над P_2O_5 . Выход кристаллического вещества 1.35 г (92.47%), т. пл. 125–127°C, R_f 0.5 (Д). ^1H -ЯМР-спектр: 1.45 (с, 9H, CH_3 , Bu^t), 1.78 (м, 2H, β - CH_2), 2.22 (т, 2H, β - CH_2 , НА), 2.82 (т, 2H, γ - CH_2), 3.12 (т, 2H, α - CH_2 , НА), 3.52 (м, 2H, α - CH_2), 6.85 (с, 1H, СН-5, Im), 7.55 (с, 1H, СН-2, Im). Найдено, %: С 55.01; Н 7.84; N 17.87. $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 55.06; Н 8.18; N 18.33.

γ -Аминобутирилгистамин (VIII). К 1.05 г (3.33 ммоль) Вос- $\gamma\text{Abu-NA}$ (V) прибавляли 4.0 мл 4 н. раствора HCl в безводном метаноле. Оставляли на 1 ч при 20°C . Растворитель удаляли в вакууме. Полученное желтое маслообразное вещество очищали на колонке с анионитом АРА-10п (ОН⁻-форма), элюируя 60% водным метанолом. Фракции с R_f 0.45 (Г) объединяли и упаривали в вакууме при 40°C . Остаток лиофилизировали. Сушили в вакууме над P_2O_5 . Выход аморфного стекловидного гидро-

скопичного вещества в количестве 0.61 г (90.77%), т. пл. 132–134°C, R_f 0.45 (Г). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1590 (Амид I), 1465 (Амид II). ^1H -ЯМР-спектр: 1.90 (м, 2H, β - CH_2), 2.35 (м, 2H, β - CH_2 , НА), 2.95 (т, 2H, γ - CH_2), 3.30 (т, 2H, α - CH_2 , НА), 3.50 (т, 2H, α - CH_2), 7.30 (с, 1H, СН-5, Im), 8.65 (с, 1H, СН-2, Im). Найдено, %: С 55.69; Н 8.07; N 28.32. $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$. Вычислено, %: С 55.16; Н 8.16; N 28.57. ВЭЖХ в условиях (2): время выхода индивидуального пика 6.41 мин.

***L*-Пироглутамилгистамин (IX).** К раствору 2.00 г (15.4 ммоль) *L*-пироглутаминовой кислоты и 2.85 г (15.49 ммоль) пентафторфенола в 20 мл безводного DMF при -10°C и интенсивном перемешивании прибавляли 3.29 г (15.9 ммоль) $\text{N,N}'$ -дициклогексилкарбодиимида. Перемешивали 2.5 ч при -10°C . Оставляли на 48 ч при 0°C . Осадок дициклогексилмочевины отделяли. К раствору прибавляли 1.72 г (15.9 ммоль) гистамина. Перемешивали 1 ч при 20°C и оставляли на 24 ч при 0°C . Растворитель удаляли в глубоком вакууме. Маслообразный остаток кристаллизовали из 7 мл безводного этанола. Оставляли на 20 ч при 0°C . Осадок отделяли фильтрованием и прибавляли 25 мл взвеси анионообменника АРА-10п (ОН⁻-форма) в 70% этаноле. Перемешивали 0.6 ч, осуществляя непрерывный хроматографический контроль в условиях (А). Раствор, содержащий вещество с R_f 0.67 (А), отделяли от ионообменника фильтрованием. Растворитель удаляли в вакууме, остаток лиофилизировали, сушили над P_2O_5 в вакууме. Выход бесцветного кристаллического вещества 1.59 г (79.5%), т. пл. 206–209°C, R_f 0.67 (А), 0.44 (Б), $[\alpha]_D^{20} -6^\circ$ (с 1, метанол). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1664 (Амид I), 1550 (Амид II). ^1H -ЯМР-спектр: 2.0 (м, 2H, β - CH_2), 2.45 (м, 2H, β - CH_2 , НА), 2.95 (т, 2H, γ - CH_2), 3.50 (т, 2H, α - CH_2 , НА), 4.30 (м, 1H, α -CH), 7.00 (с, 1H, СН-5, Im), 7.75 (с, 1H, СН-2, Im). Найдено, %: С 53.76; Н 6.48; N 24.59. $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$. Вычислено, %: С 54.05; Н 6.35; N 25.22. ВЭЖХ в условиях (1): время выхода индивидуального пика 10.5 мин.

***N*-Лауроилгистамин (X).** К раствору 0.25 г (2.25 ммоль) гистамина в 6 мл безводного DMF при интенсивном перемешивании прибавляли 0.31 мл (2.25 ммоль) триэтиламина, затем по каплям 0.54 мл (2.48 ммоль) хлорангидрида лауриновой кислоты. Через 30 мин прибавляли 0.15 мл триэтиламина до pH 8. Растворитель удаляли в вакууме, остаток промывали от избытка лауриновой кислоты ацетоном (2 \times 10 мл). Целевое вещество экстрагировали водой. Водные промывки собирали и лиофилизировали. Получали белое кристаллическое вещество в количестве 0.25 г (66.1%), т. пл. 121–125°C, R_f 0.37 (З). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1570 (Амид I), 1460 (Амид II). ^1H -ЯМР-спектр: 0.92 (т,

3H, CH₃), 1.30 (м, 16H, 8CH₂), 1.56 (т, 2H, β-CH₂), 2.17 (т, 2H, α-CH₂), 2.92 (т, 2H, β-CH₂, HA), 3.50 (т, 2H, α-CH₂, HA), 7.30 (с, 1H, CH-5, Im), 8.80 (с, 1H, CH-2, Im). Найдено, %: С 69.67; Н 10.57; N 14.29. C₁₇H₃₁N₃O. Вычислено, %: С 69.52; Н 10.56; N 14.31.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Basaga H.S.* // *Biochem. Cell Biol.* 1990. V. 68. P. 989–998.
2. *Евстигнеева Р.П., Желтухина Г.А., Агеева Е.А., Бабичаев М.А.* // Докл. РАН. 1993. Т. 333. С. 104–106.
3. *Babizhayev M.A., Seguin M.-C., Gueyne J., Evstigneeva R.P., Ageyeva E.A., Zheltukhina G.A.* // *Biochem. J.* 1994. V. 304. P. 509–516.
4. *Болдырев А.А.* // *Биохимия.* 1992. Т. 57. Вып. 9. С. 1302–1310.
5. *Flanbaum L., Brotman D.N., Fitzpatrick J.C., Van Es. Th., Kasziba E., Fisher H.* // *Life Sci.* 1990. V. 47. P. 1587–1593.
6. *Ushida K., Haraguchi K., Mitsui M., Kawakishi S.* // *Agric. Biol. Chem.* 1990. V. 54. P. 1835–1836.
7. *Овчинников Ю.А.* *Биоорганическая химия.* М.: Высш. школа, 1987. 815 с.
8. *Boldurev A.A., Dupin A.M., Batrukova M.A., Bavykina N.I., Korshunova G.A., Shvachkin Yu.P.* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1989. V. 94B. P. 237–240.
9. *Murase H., Nagao A., Terao J.* // *J. Agric. Food Chem.* 1993. V. 41. P. 1601–1604.
10. *Евстигнеева Р.П., Желтухина Г.А., Огрель С.А., Небольсин В.Е.* // Докл. РАН. 1995. Т. 345. С. 493–495.
11. *Евстигнеева Р.П., Кубатиев А.А., Ткаченко С.Б., Рожкова Е.А., Желтухина Г.А.* // Докл. РАН. 1995. Т. 340. С. 260–262.
12. *Гросс Э., Майенхофер И.* *Пептиды. Основные методы образования пептидных связей.* М.: Мир, 1983. С. 148.
13. *Гершкович А.А., Кибирев В.К.* *Химический синтез пептидов.* Киев: Наук. думка, 1992. С. 73.
14. *Aruoma O.I., Laughton M.J., Halliwell B.* // *Biochem. J.* 1989. V. 264. P. 863–869.

Effect of Conformation of *N*-Acyl Carnosine and Carcinine Topochemical Analogs on Their Antioxidant Properties

E. A. Rozhkova, S. A. Ogrel', D. N. Grigor'ev, V. E. Nebol'sin,
G. A. Zheltukhina, and R. P. Evstigneeva

Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

Abstract—To elucidate the influence of the nature of *N*-acyl substituent on antioxidant properties of carcinine analogs, the corresponding histamine derivatives were synthesized. Antioxidant activity of the compounds prepared was investigated in the Fe²⁺-ascorbate-dependent system of oxidation of the linoleic acid micellar solution. Conformations of carnosine, carcinine, and their analogs were calculated by the molecular mechanics MM⁺ method. The structural elements and conformations that are preferable for the appearance of antioxidant activity were found.

Key words: antioxidants; carnosine, carcinine, synthetic analogs; *N*-acyl substituent, conformations.