

Синтез β -поліфтороалкілвмісних γ -амінокислот і первинна оцінка їх біологічної дії

О.М. Шайтанова*, І.І. Герус, Л.О. Метелиця, Л.Л. Чарочкіна

*Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
вул. Мурманська, 1, Київ, 02094, Україна*

Резюме. На основі ди- та трифторометил- β -етоксивінілкетонів розроблено новий метод синтезу раніше невідомих фторованих похідних γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) — β -гідрокси- β -три- та -дифторметил ГАМК (у вигляді рацемату й оптично активних формах) — і аналога карнітину — β -трифторометил карнітину. Проведено первинний скринінг синтезованих сполук, встановлено, що всі вони виявляють імуно-моделюючу активність.

Ключові слова: фторовані амінокислоти, ГАМК, фагоцитарна активність, імунітет.

Вступ. 4-Аміномасляна кислота (γ -аміномасляна кислота, ГАМК) — головний гальмівний нейромедіатор у центральній нервовій системі (ЦНС). Вона знаходиться майже в 50 % усіх нервових закінчень мозку та діє через йонотропні (ГАМК_A чи ГАМК_C) або ж метаболітичні (ГАМК_B) рецептори [1, 2]. Порушення нейромедіальної функції ГАМК лежать в основі цілого ряду патологій, насамперед судомних станів, які є симптомами епілепсії, інтоксикації, інфекційних захворювань [3]. У корі великих півкуль є багато ГАМК-ергічних гальмівних інтернейронів, поза ЦНС рецептори ГАМК наявні в нейронних та інших клітинах легень, печінки, товстої кишки, ракових клітинах печінки [4]. М. Тасута з колегами першими встановили взаємозв'язок між ГАМК і раком. Також відомо, що збільшення концентрації ГАМК в організмі може блокувати ефект дії наркотичних речовин, що є перспективним у використанні в терапії наркоманії [5]. Пошук ефективних ліків на основі молекули ГАМК показав, що більш ліпофільні аналоги

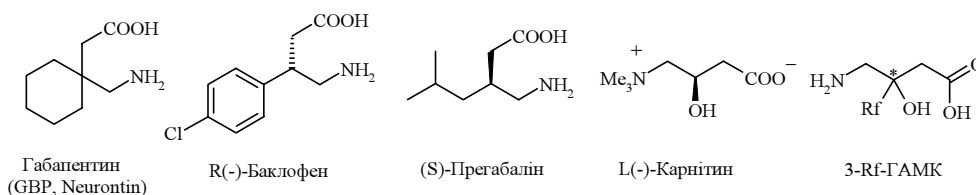
здатні легше долати гематоенцефалічний бар'єр і досить часто виявляються інгібіторами ГАМК-трансамінази. Це дає підстави говорити про перспективність таких пошуків у дизайні антиконвульсантів [6, 7].

Похідні γ -аміномасляної кислоти, що мають замісник у β -положенні, інтенсивно досліджуються у зв'язку з потенційною біологічною активністю [8]. Такі речовини, як баклофен (Lioresal® і Baclofen®) [9], габапентин (GBP, Neurontin®) [10], прегабалін [11], карнітин [12] (схема 1) використовуються для лікування ряду захворювань ЦНС. Карнітин, або вітамін В₁₂, відіграє важливу роль в обміні жирних кислот, є ліками проти міокардіальної ішемії. Дослідження показують, що введення різних замісників у β -положення молекули ГАМК призводить до значних змін активності отриманих похідних, хіральність молекули також може відігравати вирішальну роль.

Синтезовані в нашій лабораторії невідомі раніше похідні ГАМК мають у своїй структурі фтороалкільний замісник і гідроксигрупу в β -положенні (схема 1), що дає змогу говорити про потенційну біологічну активність таких сполук, оскільки стерично трифторометильна група близька до ізопропільної (прегабалін уже використовується в медицині).

* Corresponding author.
Tel.: +380472-458720
E-mail address: helen_na@ukr.net

Лікарські засоби на основі молекули ГАМК



Хімічна частина. Нещодавно ми опублікували дані про синтез рацемату та збагачених оптично активних аналогів ГАМК — трифторометил- і дифторометилмасляних кислот [13]. Ця робота є продовженням наших попередніх досліджень. Вона присвячена синтезу трифторометилвмісного карнітину й первинній оцінці біологічної активності синтезованих нами фтороалкілвмісних аналогів ГАМК і карнітину.

Як вихідні речовини для синтезу фторовмісних амінокислот використовували енони **1a,b** [14, 15] (схема 2), котрі легко приєднують Me_3SiCN до карбонільної групи. Силільовані ціангідрини **2a,b** застосовували для подальшого відновлення за допомогою LiAlH_4 з високим виходом. Алкоксивінільний фрагмент при цьому не зачіпався, тоді як триметилсилільна група в умовах обробки реакції гідролізувала. Продукти відновлення (аміноспирти **3a,b**) легко очищаються вакуумною перегонкою і є зручними синтонами для наступних перетворень.

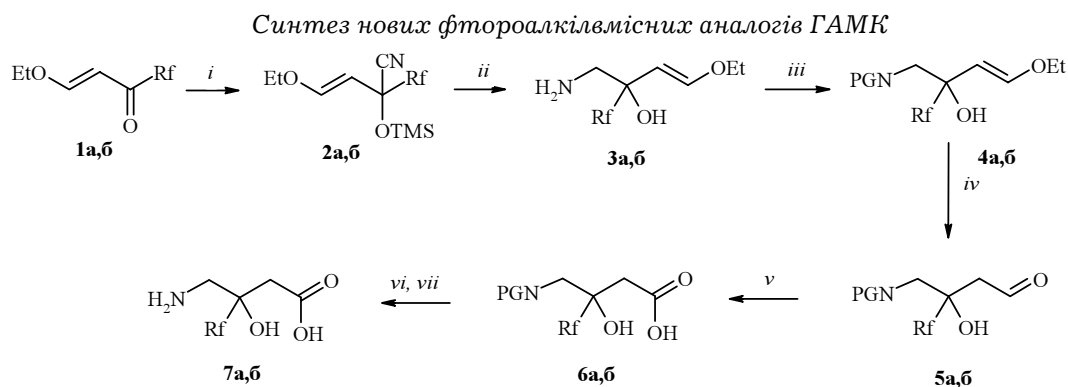
Відомо, що алкоксивінільна група мімікрує альдегідну функцію. Наші спроби отримати аміноальдеїди кислим гідролізом сполук **3a,b** виявилися невдалими через внутрішньомоле-

кулярну конденсацію вільної аміногрупи й альдегідної функції. Намагання знизити здатність аміногрупи до конденсації за допомогою ацилювання аміноспиртів **3a,b** бензоїл- або ацетилхлоридом не привело до одержання N-ациламіноальдеїду. Проте з використанням N-фтаlemідної захисної групи синтезовано продукти **5a,b** із кількісним виходом без наступного очищення. Для окиснення альдегідної групи до карбоксильної застосовували ряд окисників, однак найкращих результатів досягнуто з допомогою надлишку реагенту Джонса. Одержано кислоти **6a,b** з 90 % чистоти.

Знайдено, що сполуки **6a,b** легко утворюють сіль із рацемічним 1-фенілетиламіном (ФЕА), що й використано для їх очистки. Встановлено, що застосування оптично чистого (R)-(+)- чи (S)-(-)-ФЕА дає змогу вже після третьої кристалізації одержати відповідні діастереомерно чисті солі захищеної амінокислоти **6a** (схема 3).

Сіль (RR)-**10** кристалізували із суміші діоксан/гексан (4:1), (SS)-**10** — із суміші CH_2Cl_2 /етер (2:1) із високим діастереомерним надлишком ($de > 99\%$). Оптичну чистоту контролювали ме-

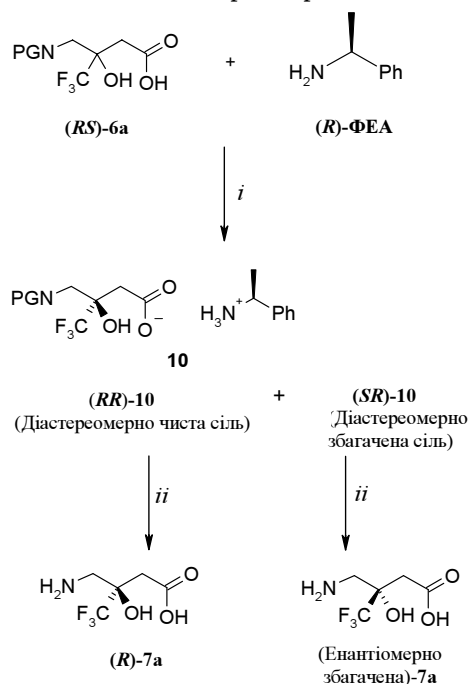
Схема 2



Rf = CF_3 (a), CHF_2 (б), PGN = N-фталемід.

Реагенти й умови: (i) Me_3SiCN , Et_3N ; (ii) LiAlH_4 в Et_2O , 30 % NaOH ; (iii) фталевий ангідрид, піридин, 110 °C; (iv) водн. HCl , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$; (v) реагент Джонса; (vi) 36 % HCl , CH_3COOH , кип'ятіння; (vii) Amberlite IR-120.

Схема 3
Розділення на енантіомери сполуки (RS)-6a методом діастереомерних солей



Реагенти й умови: (i) CH_2Cl_2 , кристалізація; (ii) зняття захисної групи.

тодами ВЕРХ на хіральних колонках і спектрального аналізу за ^{19}F ЯМР (у присутності та за відсутності зсуваючого реагенту (-)-цинхонідину). Комплексне використання цих методів дало змогу переконалися в оптичній чистоті отриманих сполук. Найбільш зручним і доступним методом виявилася ^{19}F ЯМР-спектроскопія. Спектр ^{19}F ЯМР некристалізованого зразка солі, отриманого з рацемічної (RS)-кислоти 6a та (R)-(+)- чи (S)-(-)-ФЕА, показує два сигнали однакової інтенсивності. Спектр зразка солі (RR)-10 після третьої кристалізації дає змогу бачити сигнали діастереотопних трифторометильних груп при δ -80,99 і -81,07 (як стандарт використано $CFCl_3$) у співвідношенні >99:1, що відповідає енантіомерній чистоті сполуки 6a більш ніж 98 % та вказує на успішне розділення двох енантіомерів. При додаван-

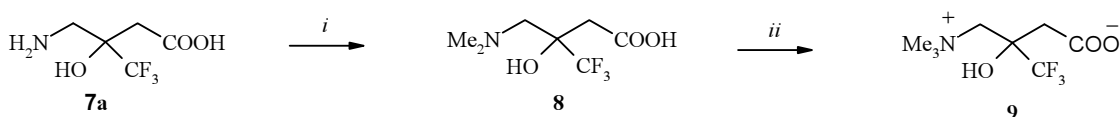
ні зсуваючого реагенту (-)-цинхонідину в спектрі ^{19}F ЯМР зразка рацемічної солі констатуємо два сигнали однакової інтенсивності, що й спостерігається у випадку діастереомерних солей 10, але різниця хімічних зсувів між ними зростає значно більше (відповідно -81,11 та -81,23). Це дає змогу точніше визначити *de* в конкретному зразку діастереомерної солі 10. Конфігурацію оптичного центру при 3 атомі вуглецю визначено за допомогою рентгеноструктурного аналізу діастереомерно чистого зразка солі (RR)-10 (кислоти 6a та (R)-(+)-1-фенілетиламіну), отриманого кристалізацією з ацетонітрилу (дані рентгеноструктурного аналізу відправлено на депозит у Cambridge Crystallographic Data Centre із присвоєнням номера CCDC-623404, deposit@ccdc.cam.ac.uk). Кристалізація солі кислоти 6b із (R)-(+)- чи (S)-(-)-ФЕА дає змогу одержати тільки збагачену суміш діастереомерів із *de* 40-50 %.

Вільні амінокислоти (RS)-7a,b отримано нагріванням (RS)-6a,b у суміші HCl/CH_3COOH ²² (10/1 по об'єму) й очищено за допомогою йонообмінної колонки. За допомогою цього ж методу синтезовано енантіомерно чисті (R)-(+)- та (S)-(-)-ГАМК 7a (схема 3).

Отриману фторовмісну амінокислоту (RS)-7a використано як вихідну сполуку в синтезі раніше невідомого β-гідрокси-β-трифторометилкарнітину. Відомо, що карнітин існує у вигляді цвіттерйону, саме через це він погано долає гематоенцефалічний бар'єр. Рухаючись у напрямку синтезу біологічно активних сполук, що будуть ефективніше долати цей бар'єр, ми збільшили ліпофільність молекули карнітину за рахунок уведення трифторометильної групи у β-положення.

Відновне метилювання кислоти (RS)-7a проведено за методикою [12] у водному формальдегіді за присутності 20 % Pd/C з отриманням N,N-диметиламінопохідного (норкарнітину) (RS)-8a з виходом 70 % після катіоніту.

Схема 4
Синтез трифторометильмісного аналога карнітину 9



Реагенти й умови: (i) водн. CH_2O , Pd/C; (ii) MeI, ДМФА, аніоніт.

Схема 4

Вплив досліджуваних сполук на проліферативну й розеткоутворюючу активність спленоцитів мишей, імунізованих еритроцитами барана

Сполука	Кількість спленоцитів $\times 10^6$ на 1 г селезінки		Кількість Е-РУК на 1×10^6 спленоцитів
	Через 1 добу	Через 5 днів	Через 4 доби
контроль	19,2 \pm 1,5	19,6 \pm 1,3	14,7 \pm 1,1
(RS)-7a	15,1 \pm 0,6*	17,6 \pm 1,0	10,3 \pm 0,8*
(R)-7a	19,0 \pm 1,0	18,0 \pm 1,2	9,3 \pm 0,7*
(RS)-9	18,3 \pm 1,3	17,6 \pm 1,4	10,4 \pm 0,8*
(RS)-7b	13,2 \pm 1,2*	20,0 \pm 1,8	9,4 \pm 1,1*
(R збаг)-7b	17,6 \pm 1,6	17,3 \pm 1,1	5,3 \pm 0,5*

Примітка: * — значення достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від контрольного.

Метилування продукту (RS)-8a за допомогою надлишку MeI у ДМФА з наступним використанням йонообмінної колонки (аніоніт Amberlite IRA-400) дало (RS)-карнітин 9 (схема 4).

Біологічна частина. Дані про широкий спектр біологічної дії подібних сполук — аналогів ГАМК — дають підстави очікувати, що синтезовані нами речовини можуть виявляти імуномодельючі властивості *in vivo*. Ці сполуки протестовано в реакціях первинної імунної реактивності мишей на моделях *in vitro* та *in vivo*. Для первинної оцінки біологічної активності синтезованих речовин проводилося біологічне тестування на мишах. Перевіряли вплив цих сполук на гуморальну ланку імунної системи організму, важливим критерієм якої є аналіз клітинного складу селезінки. При внутрішньочеревному введенні речовин відбувається проліферація стовбурових імунокомпетентних клітин у селезінці. Згодом у кровообігу вони диференціюються в ефекторні плазматичні клітини, що здатні синтезувати специфічні антитіла. Зміна кількості цих клітин має велике значення для процесу формування гуморального імунітету [16]. Здобуті результати оброблено статистично й подано в таблицях.

У табл. 1 наведено результати впливу *in vivo* досліджуваних сполук на проліферативну й розеткоутворюючу активність спленоцитів мишей, імунізованих еритроцитами барана. Ці дані свідчать про те, що через 1 добу після введення імунізованим тваринам (RS)-7a та (RS)-7b відбувається зменшення клітинного складу селезінки, тоді як через 5 днів склад її лімфоїдних компонентів, головним чином В-антиген-специфічних лімфоцитів, повністю нормалізується.

У той же час на 5 добу після імунізації тварин усі досліджувані сполуки достовірно пригнічують функціональну активність В-імунокомпетентних спленоцитів мишей. Так, сполука (R збаг)-7b значною мірою (у 2,7 раза), а (RS)-7a, (R)-7a, (RS)-9 і (RS)-7b менш ефективно (в 1,6 раза) пригнічують розеткоутворюючу функцію лімфоїдних клітин селезінки, які відповідають, головним чином, за потенційний розвиток реакцій гуморального імунітету.

Дані, подані в табл. 2, свідчать про те, що вплив сполук *in vitro* на розеткоутворюючу функцію спленоцитів неімунізованих мишей, яка здійснюється Т-імунокомпетентними лімфоцитами селезінки, що відповідають за роз-

Вплив досліджуваних сполук на спонтанне розеткоутворення спленоцитів неімунізованих мишей

Сполука	Кількість РУК (1×10^3) за різних концентрацій сполук, М/л				
	1×10^{-2} М/л	1×10^{-3} М/л	1×10^{-4} М/л	1×10^{-5} М/л	1×10^{-6} М/л
контроль	3,1 \pm 0,27	3,1 \pm 0,27	3,1 \pm 0,27	3,1 \pm 0,27	3,1 \pm 0,27
(RS)-7a	1,4 \pm 0,12*	3,2 \pm 0,31	6,0 \pm 0,58*	5,8 \pm 0,47*	3,0 \pm 0,28
(R)-7a	2,0 \pm 0,19*	3,7 \pm 0,31	2,5 \pm 0,16	2,5 \pm 0,21	3,0 \pm 0,26
(RS)-9	6,5 \pm 0,58*	5,3 \pm 0,50*	3,3 \pm 0,62	2,5 \pm 0,21	3,1 \pm 0,30
(RS)-7b	2,0 \pm 0,21*	6,0 \pm 0,56*	7,3 \pm 0,31*	4,7 \pm 0,40*	4,0 \pm 0,36
(R збаг)-7b	2,1 \pm 0,20*	3,0 \pm 0,25	2,8 \pm 0,16	3,5 \pm 0,27	3,0 \pm 0,20

Примітка: * — значення достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від контрольного.

Таблиця 3

Вплив досліджуваних сполук на фагоцитарну активність поліморфноядерних лейкоцитів крові мишей

Сполука	Кількість фагоцитів на 100 ПМЯЛ	
	Через 1 добу	Через 5 дб
контроль	63,0 \pm 1,0	65,0 \pm 1,6
(RS)-7a	43,3 \pm 2,5*	53,7 \pm 2,8*
(R)-7a	69,0 \pm 3,0	65,7 \pm 2,5
(RS)-9	66,0 \pm 2,9	68,3 \pm 1,0
(RS)-7б	20,7 \pm 1,9*	53,7 \pm 4,0*
(R збаг)-7б	49,7 \pm 3,0*	46,0 \pm 3,7*

Примітка: * — значення достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від контрольного.

виток реакцій клітинного імунітету [17], має виражений дозозалежний імуномодулюючий характер. Так, додавання до лімфоцитарної суспензії селезінки сполук у концентрації 1×10^{-2} М/л, за винятком сполуки (RS)-9, приводить до достовірного пригнічення розеткоутворюючої активності лімфоїдних клітин. Сполука (RS)-9 у цій концентрації стимулює (у 2 рази порівняно з контролем) досліджувану функцію лімфоцитів. Слід сказати, що зі зменшенням концентрацій доданих до лімфоцитарної суспензії сполук зареєстровані показники їх впливу змінюються в бік стимулювання. Додавання до суспензії спленоцитів сполук у концентрації 1×10^{-6} М/л виявилось неефективним.

У табл. 3 наведено показники фагоцитарної активності поліморфноядерних лейкоцитів (ПМЯЛ), отриманих із крові мишей на 1 і 5 добу після введення тваринам синтезованих сполук. Дані засвідчують, що лише сполуки (RS)-7a, (RS)-7б і (R збаг)-7б пригнічували вплив на фагоцитарну реакцію нейтрофільних лейкоцитів крові як на 1, так на 5 добу дослідження. Така ефективність сполук дозволяє віднести їх до потенційних супресорів антибактеріального та противірусного імунітету [18].

Висновки. Проведено первинний скринінг синтезованих сполук як потенційних модулаторів імунної реактивності, що дає змогу віднести ці речовини до біологічно активних, які виявляють модулюючу активність на зазначених моделях реакцій гуморального і клітинного імунітету, а також неспецифічної резистентності організму. Встановлено, що імунотропність препарату залежно від дози, схеми

введення і якісних особливостей використаного антигена, способу й часу імунізації може суттєво змінюватися в бік імуносупресії або імуностимуляції. Найбільшу імуноактивність виявлено для сполук (RS)-7a і (RS)-7б, що свідчить про перспективність подальшого вивчення їх як потенційно біологічно активних речовин.

Експериментальна частина.

Біологічна частина. Первинний скринінг нових хімічних сполук проведено на модельних системах *in vitro* та *in vivo*, що кількісно та якісно характеризують дію сполук на основні ланки імунітету, функціонування яких забезпечує розвиток реакцій клітинного й гуморального типу, а також неспецифічної резистентності організму.

Експеримент проводився на безпородних мишах-самках вагою 25-30 г. На моделях *in vivo* еквімолярні концентрації досліджуваних сполук вводили тваринам одноразово внутрішньочеревно з розрахунку 2×10^{-4} моль речовини у фізіологічному розчині на 100 г маси тіла. На моделі *in vitro* вивчали дію сполук у діапазоні концентрацій від 1×10^{-2} до 1×10^{-6} моль речовини/л суспензії лімфоцитів селезінки неімунізованих мишей.

Модель потенційної реактивності гуморального імунітету тварин відтворювали за допомогою методу «імуних розеток» [19]. Для цього мишей внутрішньочеревно імунізували еритроцитами барана одночасно з досліджуваною сполукою. На п'яту добу після імунізації в підготовлених мазках клітин селезінки експериментальних тварин під час мікроскопіювання підраховували кількість спленоцитів, що утворили «розетки» з не менш як п'ятьма еритроцитами барана. На 1 та 2 добу після імунізації також визначали кількісний склад лімфоїдних елементів селезінки мишей, суттєві зміни якого позначаються на подальших процесах розвитку гуморальної ланки імунітету [16].

Показником потенційної реактивності клітинного імунітету слугував рівень спонтанного *in vitro* розеткоутворення спленоцитів інтактних, неімунізованих, мишей з еритроцитами барана [20]. Для цього лімфоцити селезінки 20 хв інкубували із суспензією еритроцитів барана у співвідношенні 1:5 і в підготовлених

мазках під час мікроскопіювання підраховували кількість спленоцитів, що утворили «розетки» з не менш як п'ятьма еритроцитами.

Дію сполук на неспецифічну реактивність організму виявляли в реакції фагоцитозу ПМЯЛ крові мишей [21] через 24 год після введення тваринам досліджуваних речовин. Агентам фагоцитозу слугував *Staphylococcus aureus* (шт.209).

За контроль у всіх застосованих модельних системах (*in vitro* та *in vivo*) взято показники активності, зареєстровані в реакціях із використанням аліквот фізіологічного розчину замість досліджуваних сполук.

Здобуті результати оброблено статистично [22] й подано в таблицях.

Матеріали: (*RS*)-4,4,4-трифторо-3-гідрокси-3-(амінометил)-бутанова кислота (*RS*)-**7a**, (*R*)-4,4,4-трифторо-3-гідрокси-3-(амінометил)-бутанова кислота (*R*)-**7a**, (*RS*)-4,4,4-трифторо-3-гідрокси-3-(триметиламоній)-бутанова кислота (*RS*)-**9**, (*RS*)-4,4-дифторо-3-гідрокси-3-(амінометил)-бутанова кислота (*RS*)-**7б**, (*R*-збагачена)-4,4-дифторо-3-гідрокси-3-(амінометил)-бутанова кислота (*R збаг*)-**7б**.

Хімічна частина. Спектри ^1H , ^{13}C та ^{19}F ЯМР записано на приладах «Varian Unian Plus-400» і «Bruker Avance DRX-500» із використанням ТМС і CCl_3F як стандартів. Оптичне обертання виміряно на поляриметрі Perkin Elmer Polarimeter 341. Хід реакцій та чистоту синтезованих сполук контролювали методом ТШХ на пластинках Merck 60 F_{254} . Усі розчинники й рідкі реагенти перед використанням переганяли. Вихідні речовини синтезували за описаними в літературі методиками (Е-1,1,1-трифторо-4-етокси-3-бут-3-ен-2-он [14], Е-4-етокси-1,1-дифторо-бут-3-ен-2-он [15]), які застосовували в синтезі триметилсилільованих ціангідринів за методикою [23].

Загальна методика отримання аміноспиртів 3a,б. До суспензії LiAlH_4 (2,03 г, 53,5 ммол) у сухому етері (50 мл) покрупинно додають аддукт **2a,б** (48,6 ммол), перемішуючи протягом 30 хв за 0-5 °С. Суміш залишають на ніч при кімнатній температурі. Надлишок LiAlH_4 розкладають 30 % NaOH (10 мл), перемішуючи за 0 °С. Гідроксид алюмінію відфільтровують і промивають етером (50 мл x 3). Фільтрат висушують (MgSO_4) та концентрують при пониже-

ному тиску. Залишок очищають перегонкою у вакуумі.

(*E*)-1,1,1-Трифторо-4-етокси-2-(амінометил)-3-бутен-2-ол (**3a**). (88 %); $T_{\text{кип}}$ 85-90 °С/0,1 ммHg; ^1H NMR (500 МГц, CDCl_3) δ : 1,32 (т., 3H, $J=7,1$ Hz), 2,16 (с., 3H), 2,7 (д., 1H, $J=13,0$ Hz), 3,12 (д., 1H, $J=13,0$ Hz), 3,77 (к., 2H, $J=7,1$ Hz), 4,7 (д., 1H, $J=12,5$ Hz), 6,75 (д., 1H, $J=12,5$ Hz); ^{19}F NMR (470,5 МГц, CDCl_3) δ : -81,60 (с.); ^{13}C NMR (125 МГц, CDCl_3) δ : 14,62, 45,3, 65,46, 72,51 (к., $J=35,0$ Hz), 99,27, 125,86 (к., $J=285,0$ Hz), 150,9. Обчислено для $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_2$: С, 42,21; Н, 6,07; N, 7,03. Знайдено: С, 42,36; Н, 6,25; N, 7,01.

(*E*)-1,1-Дифторо-4-етокси-2-(амінометил)-3-бутен-2-ол (**3б**). (80 %); $T_{\text{кип}}$ 90-95 °С/0,1 ммHg; ^1H NMR (500 МГц, CDCl_3) δ : 1,29 (т., 3H, $J=7,1$ Hz), 2,28 (с., 3H), 2,73 (д., 1H, $J=13,0$ Hz), 3,05 (д., 1H, $J=13,0$ Hz), 3,77 (к., 2H, $J=7,1$ Hz), 4,69 (д., 1H, $J=12,5$ Hz), 5,57 (т., 1H, $J=56,1$ Hz), 6,68 (д., 1H, $J=12,5$ Hz); ^{19}F NMR (470,5 МГц, CDCl_3) δ : -130,77 (дд., 1F, $J_{\text{FF}}=272,1$ Hz, $J_{\text{FH}}=56,1$ Hz), -125,98 (дд., 1F, $J_{\text{FF}}=272,1$ Hz, $J_{\text{FH}}=56,1$ Hz). ^{13}C NMR (125 МГц, CDCl_3) δ : 14,58, 44,91, 65,24, 72,61 (т., $J=21,5$ Hz), 100,46, 117,34 (т., $J=248,5$ Hz), 150,24. Обчислено для $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{F}_2\text{NO}_2$: С, 46,40; Н, 7,23; N, 7,73. Знайдено: С, 46,29; Н, 7,34; N, 7,65.

(*E*)-4-Етокси-2-гідрокси-2-трифторометил-бут-3-іл-ізоіндол-1,3-діон (**4a**). Розчин фталевого ангідриду (6,32 г, 42,6 ммол) та аміну **3a** (8,5 г, 42,6 ммол) у безводному піридині (30 мл) перемішують протягом 12 год за 35-40 °С, потім кип'ятять 24 год. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури й випаровують при пониженому тиску, додають 20 мл хлористого метилену. Розчин промивають 1 % соляною кислотою (HCl), водою. Органічний шар висушують над MgSO_4 та концентрують у вакуумі. Продукт очищають кристалізацією з етер/гексану (2:1), отримуючи фталемід **4a** у вигляді білої кристалічної речовини (10 г, 71 %). $T_{\text{пл}}$ 77 °С; ^1H NMR (500 МГц, CDCl_3) δ : 1,21 (т., 3H, $J=7,1$ Hz), 3,69 (к., 2H, $J=7,1$ Hz), 4,01 (д., 1H, $J=14,5$ Hz), 4,11 (д., 1H, $J=14,5$ Hz), 4,68 (д., 1H, $J=12,5$ Hz), 6,73 (д., 1H, $J=12,5$ Hz), 7,77 (м., 2H), 7,89 (м., 2H); ^{19}F NMR (470,5 МГц, CDCl_3) δ : -81,64 (с). Обчислено для $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_4$: С, 54,72; Н, 4,29; N, 4,25; Знайдено: С, 54,70; Н, 4,38; N, 4,28.

3-(1,3-Діоксо-1,3-дигідроізоіндол-2-ілметил)-4,4,4-трифторо-3-гідроксибутираль-

дегід (**5a**). До **4a** (2 г, 6 ммол) в ацетонітрилі (4 мл) та воді (2 мл) додають 5 % HCl (1 мл). Розчин залишають за кімнатної температури протягом однієї доби. Розчинники випаровують у вакуумі й отримують продукт (1,8 г, 98 %) у вигляді жовтого масла. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 2,69 (д, 1H, $J=16,5$), 2,85 (д, 1H, $J=16,5$ Hz), 4,07 (д, 1H, $J=14,5$ Hz), 4,14 (д, 1H, $J=14,5$ Hz), 7,80 (м., 2H), 7,91 (м., 2H), 9,82 (с., 1H); ^{19}F NMR (470,5 MHz, CDCl_3) δ : -80,64 (с).

3-(1,3-Діоксо-1,3-дигідроізоіндол-2-ілметил)-4,4-дифторо-3-гідроксибутиральдегід (**5b**). Сполуку отримано з аміну **3b** за тією ж методикою, що і **5a**, без виділення проміжного продукту **4b**, оскільки ця речовина легко гідролізується (90 %, жовте масло). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 2,71 (д, 1H, $J=17,0$ Hz), 2,81 (д, 1H, $J=17,0$ Hz), 3,99 (с., 2H), 5,89 (т., 1H, $J_{\text{FH}}=56,1$ Hz), 7,75 (м., 2H), 7,86 (м., 2H), 9,78 (с., 1H). ^{19}F NMR (470,5 MHz, CDCl_3) δ : -132,63 (дд., 1F, $J_{\text{FF}}=272,1$ Hz, $J_{\text{FH}}=56,1$ Hz), -131,70 (дд., 1F, $J_{\text{FF}}=272,1$ Hz, $J_{\text{FH}}=56,1$ Hz).

3-(1,3-Діоксо-1,3-дигідроізоіндол-2-ілметил)-4,4,4-трифторо-3-гідроксибутанова кислота (**6a**). Розчин альдегіду **5a** (1,8 г, 5,9 ммол) в ацетоні (10 мл) покращено додають до розчину реагенту Джонса (5 мл) за нормальних умов і перемішування протягом 5 год. Надлишок реагенту розкладають за допомогою ізопропанолу (5 мл), залишок промивають хлористим метиленом (2x100 мл). Розчин промивають водою (200 мл) і висушують над MgSO_4 . Органічну фракцію концентрують у вакуумі, отримуючи сполуку **6a** (1,5 г, 80 %), зеленуватий порошок. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 2,77 (д, 1H, $J=16,5$ Hz), 2,91 (д, 1H, $J=16,5$ Hz), 4,11 (д, 1H, $J=14,5$ Hz), 4,21 (д, 1H, $J=14,5$ Hz), 7,77 (м., 2H), 7,89 (м., 2H); ^{19}F NMR (470,5 MHz, CDCl_3) δ : -80,90 (с); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 36,08, 41,24, 74,29 (к., $J=28,8$ Hz), 123,45 (к., $J=285$ Hz), 123,91, 131,55, 134,65, 168,67, 174,54. Обчислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_5$: C, 49,22; H, 3,18; N, 4,42. Знайдено: C, 49,12; H, 3,25; N, 4,33.

3-(1,3-Діоксо-1,3-дигідроізоіндол-2-ілметил)-4,4,4-трифторо-3-гідроксибутанова кислота (**6b**). Сполуку отримано з альдегіду **5b** за тією ж методикою, що й кислоту **6a**, (80 %), зеленуватий порошок. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 2,68 (д, 1H, $J=16,8$ Hz), 2,82 (д, 1H, $J=16,8$ Hz), 4,06 (с., 2H), 6,01 (т., 1H, $J=56,1$ Hz),

7,76 (м., 2H), 7,88 (м., 2H). ^{19}F NMR (470,5 MHz, CDCl_3) δ : -133,11 (дд., 1F, $J_{\text{FF}}=286,4$ Hz, $J_{\text{FH}}=55,4$ Hz), -132,20 (дд., 1F, $J_{\text{FF}}=286,4$ Hz, $J_{\text{FH}}=55,4$ Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 35,93, 41,00, 73,53 (т., $J=21,5$ Hz), 115,28 (т., $J=248,5$ Hz), 123,80, 131,66, 134,53, 168,93, 175,09. Обчислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{NO}_5$: C, 52,18; H, 3,71; N, 4,68. Знайдено: C, 52,27; H, 3,90; N, 4,58.

Загальна методика приготування діастереомерних солей 10. Розділення енантіомерів кислоти **6a** проводили в такий спосіб: (*R*)-(+)- чи (*S*)-(-)-ФЕА (0,57 г, 4,73 ммол) і (*RS*)-**6a** (1,5 г, 4,73 ммол) змішували у хлористому метилені (10 мл), залишали на 15 хв за кімнатної температури, після чого розчинник випаровували. Залишок кристалізували із суміші діоксану/гексану (2/1) у випадку (*R*)-ФЕА та із суміші хлористого метилену/етеру (1,5/1) для (*S*)-ФЕА. Після третьої кристалізації отримували діастереомерно чисту сіль, білі кристали. $T_{\text{пл}}$ 150 °C для рацемічної солі та 163 °C для діастереомерно чистої солі (0,6 г, 30,6 %, >99 % de); (*RR*)-**10**: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=-15,82^\circ$ (с 0,67, CHCl_3); (*SS*)-**10**: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=+15,80^\circ$ (с 0,68, CHCl_3).

Загальна методика отримання β -гідрокси- β -поліфторометил- γ -амінобутанових кислот 7a,б. Суміш N-захисненої амінокислоти **6a,б** (1,0 ммол), оцтової кислоти (3,0 мл) і 6 N HCl (30 мл) нагрівають протягом 3–4 год за 120 °C, контролюючи проходження реакції методом ТПХ. Продукт охолоджують до кімнатної температури, розчинники випаровують у вакуумі, після чого додають воду до залишку (30 мл) і екстрагують етилацетатом (2x30 мл). Водну фракцію концентрують у вакуумі, пропускають через Amberlite IR-120 йонообмінну колонку та змивають кислоту 3 % вод. NH_4OH , отримуючи рацемічну або (*R*)- чи (*S*)-амінокислоту **7a,б** відповідно до оптичної чистоти вихідних кислот **6a,б**.

4,4,4-Трифторо-3-гідрокси-3-(амінометил)-бутанова кислота (**7a**). (90 %) біла кристалічна речовина, (*R*)-**7a**: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=+32,2^\circ$ (с 0,8, 1 % NH_3). ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ : 2,60 (с., 2H), 3,25 (д, 1H, $J=13,9$ Hz), 3,32 (д, 1H, $J=13,9$ Hz); ^{19}F NMR (470,5 MHz, D_2O) δ : -81,29 (с); ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ : 37,75, 41,84, 71,38 (к., $J=28,8$ Hz), 126,15 (к., $J=285,0$ Hz), 176,34. Обчислено для $\text{C}_5\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$: C, 32,09; H, 4,31; N, 7,49. Знайдено: C, 32,07; H, 4,48; N, 7,45.

4,4-Дифторо-3-гідрокси-3-(амінометил)-бутанова кислота (**7b**). (92 %) світло-коричневі кристали. ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ : 2,71 (д, 1H, $J=16,5$ Hz), 2,75 (д, 1H, $J=16,5$ Hz), 3,28 (д, 1H, $J=14,2$ Hz), 3,32 (д, 1H, $J=14,2$ Hz), 5,99 (т, 1H, $J=56,1$ Hz); ^{19}F NMR (470,5 MHz, D_2O) δ : -132,9 (дд, 1F, $J_{\text{FF}}=286,1$ Hz, $J_{\text{FH}}=55,1$ Hz), -131,81 (дд, 1F, $J_{\text{FF}}=286,1$ Hz, $J_{\text{FH}}=55,1$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ : 38,77, 41,67, 70,42 (т, $J=21,5$ Hz), 116,15 (т, $J=248,5$ Hz), 176,94. Обчислено для $\text{C}_5\text{H}_9\text{F}_2\text{NO}_3$: С, 35,51, Н, 5,36, N, 8,28. Знайдено: С, 35,75, Н, 5,44, N, 8,22.

4,4,4-Трифторо-3-гідрокси-3-(диметиламіно)-бутанова кислота (**9a**). До амінокислоти (0,06 г, 0,32 ммол) додають 37 % водний формальдегід (0,65 мл), воду (5,3 мл) та 0,05 г 20 % Pd/C. Реакцію проводять протягом трьох діб за 12 атм водню і перемішування. Суміш відфільтровують через силікагель і випаровують. Після очищення за допомогою катіоніту Amberlite IR-120 отримують диметиламіно-ГАМК (норкарнітин) у вигляді білих кристалів (70 %). ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 2,66 (с., 2H),

2,84 (с., 6H), 3,39 (м., 2H); ^{19}F NMR (470,5 MHz, D_2O) δ : -82,7 (с); ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ : 39,44, 45,94, 59,68, 72,27 (к., $J=28,8$ Hz), 124,69 (к., $J=285,0$ Hz), 176,04. Обчислено для $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_3$: С, 39,07, Н, 5,62, N, 6,51. Знайдено: С, 39,12, Н, 5,75, N, 6,37.

4,4,4-Трифторо-3-гідрокси-3-(триметиламоній)-бутанова кислота (**8a**). Суміш диметиламінокарнітину **7a** (42 мг, 0,20 ммол), надлишок йодистого метилу (1,4 мл) та ДМФА (1,4 мл) при перемішуванні витримують протягом доби за 20 °С. Потім розчин концентрують у вакуумі та очищають за допомогою аніоніту Amberlite IRA-400, промиваючи колонку водою. Вихід — (\pm)-карнітин **9a** (80 %). ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ : 2,64 (д., 1H, $J=16,0$ Hz), 2,74 (д., 1H, $J=16,0$ Hz), 3,29 (с., 9H), 3,61 (д., 1H, $J=15,0$ Hz), 3,76 (д., 1H, $J=15,0$ Hz); ^{19}F NMR (470,5 MHz, D_2O) δ : -82,01 (с). Обчислено для $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NO}_3$: С, 41,56, Н, 6,98, N, 6,06. Знайдено: С, 41,72, Н, 7,11, N, 6,07.

Надійшла в редакцію 12.04.2007 р.

Synthesis of β -polyfluoroalkyl containing γ -aminoacids and the preliminary study of the biological activity

E.N. Shaitanova, I.I. Gerus, L.A. Metelitsa, L.L. Charochkina

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine
1 Murmanska Str., Kyiv, 02094, Ukraine

Summary. New and effective method to the synthesis of polyfluoroalkyl containing analogues of GABA (β -hydroxy- β -tri- and difluoromethyl GABAs) and β - CF_3 -carnitine, unknown till now, was developed based on the reaction of 1,2-addition to enones **1a,b**. Both the racemic and two enantio pure forms were obtained; synthesized analogues were examined for biological activity. Most of all the synthesized compounds demonstrated immunomodulation activity.

Keywords: fluorinated amino acids, GABA, chiral resolution with PEA, phagocytic activity, immunity.

Перелік літератури

1. Chebib M., Johnston, G.A.R. GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology // *J. Med. Chem.* — 2000. — Vol. 43. — P. 1428-1447.
2. Chebib M., Johnston G.A.R. The ABC of GABA receptors: a brief review // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* — 1999. — Vol. 26. — P. 937-940.
3. Yuan H., Silverman R.B. New substrates and inhibitors of γ -aminobutyric acid aminotransferase containing bioisosteres of the carboxylic acid group: design, synthesis, and biological activity // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* — 2006. — Vol. 14. — P. 1331-1338.
4. Ortega A. A new role for GABA: inhibition of tumor cell migration // *Trends in Pharmacological Sciences.* — 2003. — Vol. 24, No. 4. — P. 151-154; Minuk G.Y. Gaba and hepatocellular carcinoma // *Mol. Cell. Biochem.* — 2000. — Vol. 207. — P. 105-108.
5. Kusher S.A., Dewey S.L., Kornetsky C.J. The irreversible γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase inhibitor γ -vinyl-GABA blocks cocaine self-administration in rats // *Pharmacol. Exp. Ther.* — 1999. — Vol. 290. — P. 797.
6. Silverman R.B., Durkee S.C., Invergo B.J.J. 4-Amino-2-(substituted methyl)-2-butenic acids: substrates and potent inhibitors of gamma-aminobutyric acid aminotransferase // *Med. Chem.* — 1986. — Vol. 29. — P. 764-770; Stefan H., Feuerstein T.J. Novel anticonvulsant drugs // *Pharmacology & Therapeutics.* — 2007. — Vol. 113. — P. 165-183; Yuan H., Silverman R.B. Structural modifications of (1*S*,3*S*)-3-amino-4-difluoromethylenecyclopentanecarboxylic acid, a potent irreversible inhibitor of GABA aminotransferase // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* — 2007. — Vol. 17. — P. 1651-1654.
7. Ragavendran J.V., Sriram D., Patel S.K., Reddy I.V., Bharathwajan N., Stables J. Yogeeswari P. Design and synthesis of anticonvulsants from a combined phthalimide-GABA-anilide and hydrazone pharmacophore //

European Journal of Medicinal Chemistry. — 2007. — Vol. 42. — P. 146-151.

8. Aguirre D., Cativiela C., Díaz-de-Villegas M.D., Gálvez J.A. First asymmetric synthesis of an acyclic β , β -dialkylated- γ -aminobutyric acid // Tetrahedron. — 2006. — Vol. 62. — P. 8142-8146.

9. Felluga F., Gombac V., Pitacco G., Valentin E. A short and convenient chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of 3-phenylGABA and 3-(4-chlorophenyl)GABA (Baclofen) // Tetrahedron: Asymmetry. — 2005. — Vol. 16. — P. 1341-1345; Moglioni A.G. Stereoselective synthesis of cyclobutyl GABA analogues and related compounds from (-)-(*S*)-verbenone // Tetrahedron: Asymmetry. — 2002. — Vol. 13. — P. 451-454.

10. Bryans J.S., Wustrow D.J. 3-Substituted GABA analogs with central nervous system activity: a review // Med Res Rev. — 1999. — Vol. 19. — P. 149-177; Field M.J., Oles R.J., Lewis A.S., McCleary S., Hughes J. Gabapentin (neurontin) and *S*-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents // British Journal of Pharmacology. — 1997. — Vol. 121. — P. 1513-1522.

11. Belioti T.R., Caparis T., Ekhato V., Kinsora J.J., Field M.J., Heffner T.G., Meltzer L.T., Schwarz J.B., Taylor C.P., Thorpe A.J., Vartanian M.G., Wise L.D., Zhu-Su Ti, Weber M.L., Wustrow D.J. Structure-activity relationships of pregabalin and analogues that target the $\alpha_2\text{-}\delta$ protein // J. Med. Chem. — 2005. — Vol. 48. — P. 2294-2307.

12. Jain R.P., Williams R.M. Asymmetric synthesis of (*S*)-(+)-carnitine and analogs // Tetrahedron. — 2001. — Vol. 57. — P. 6505-6509; Kolb H.C., Bennani Y.L., Sharpless K.B. Short and practical syntheses of (*R*)-(-)-carnitine and (*R*)-(-)- γ -amino- β -hydroxybutyric acid (GABOB) // Tetrahedron: Asymmetry. — 1993. — Vol. 4. — P. 133-141.

13. Shaitanova E.N., Gerus I.I., Belik M.Yu and Ku-

khara V.P. Synthesis of optically active β -hydroxy- β -polyfluoromethyl GABAs // Tetrahedron: Asymmetry. — 2007. — Vol. 18. — P. 192-198.

14. Hojo M., Masuda R., Kokuryo Y., Shioda H., Matsuo S. Electrophilic substitutions of olefinic hydrogens II. acylation of vinyl ethers and *N*-vinyl amides // Chem. Lett. — 1976. — Vol. 5. — P. 499-502.

15. Gorbunova M.G., Gerus I.I., Kukhar V.P. Synthesis and properties of β -Ethoxyvinyl polyfluoroalkyl ketones // Synthesis. — 2000. — Vol. 5. — P. 738-742.

16. Петров Р.В. Иммунология. — М.: Медицина, 1987. — С. 98-99.

17. Gergely P., Szegedi Gy., Fekete B., Szabo G., Pet-ranyi Gy. Rosette formation and T-cells // Lancet. — 1973. — Vol. 1. — P. 883.

18. Дуглас С.Д., Кук П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике. — М.: Медицина, 1983. — С. 152.

19. Иммунология. Практикум. — К.: Вища школа, 1989. — С. 212-214.

20. Laskov R. Rozette forming cells in nonimmunized // Nature. — 1968. — Vol. 219, No. 5157. — P. 973-975.

21. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е.А. Кост. — М.: Медицина, 1968. — С. 38-40.

22. Сенетлиев Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях. — М.: Медицина, 1968. — С. 420.

23. Gerus I.I., Kruchok I.S., Kukhar V.P. Regioselective addition of trimethylsilyl cyanide to *E*-1,1,1-trifluoro-4-ethoxybut-3-en-2-one // Tetrahedron Letters. — 1999. — Vol. 40. — P. 5923-5926; Kruchok I.S., Gerus I.I., Kukhar V.P. Regioselective addition of trimethylsilyl cyanide to β -alkoxyvinyl alkyl ketones // Tetrahedron. — 2000. — Vol. 56. — P. 6533-6539.