

П. А. Полубояринов (к. с.-х. н., доц.), И. Я. Моисеева (д.м.н., проф.),
Н. И. Микуляк (д.м.н., доц.)*

НОВЫЙ СИНТЕЗ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ – *D*-ЦИСТИНА И 3,3-ДИМЕТИЛ-*D*-ЦИСТИНА

Пензенский государственный университет,
кафедра «Общая и клиническая фармакология», *кафедра «Физиология человека»
440026, г. Пенза, ул. Красная, 40; тел. (950) 2304876, e-mail: poluboyarinovpavel@yandex.ru

P. A. Poluboyarinov, I. Ya. Moiseeva, N. I. Mikulyak

NEW SYNTHESIS OF SULPHUR CONTAINING AMINOACIDS – *D*-CYSTINE AND 3,3-DIMETHYL-*D*-CYSTINE

Penza State University
40, Krasnaya Str., 440026, Penza, Russia; ph. (950) 2304876, e-mail: poluboyarinovpavel@yandex.ru

В ходе проведенных исследований разработан новый синтез изомеров серосодержащих аминокислот – *D*-цистина и 3,3'-диметил-*D*-цистина из *D*-серина и *D*-треонина, через галогенсодержащие аминокислоты – β -хлор-*D*-аланин и α -амино- β -хлор-*D*-масляную кислоту. Он может быть использован как удобный лабораторный синтез аминокислоты *D*-цистина, 3,3'-диметил-*L*-цистина или 3,3-диметил-*D*-цистина, достоинством которого является простота, доступные реактивы, отсутствие необходимости использования защитных групп. Выход β -хлор-*D*-аланина, (αR , βS)- α -амино- β -хлормасляной кислоты составляет не менее 50%, *D*-цистина 79 %, а 3,3-диметил-*D*-цистина не менее 55%.

Ключевые слова: аминокислоты; α -амино- β -хлор-*D*-масляная кислота; 3,3'-диметил-*D*-цистин, β -хлор-*D*-аланин; *D*-серин; синтез; *D*-треонин; *D*-цистин.

Аминокислоты *L*-цистеин и *L*-цистин являются эссенциальными α -аминокислотами разнообразных живых организмов ^{1–3}. *L*-Цистеин/*L*-цистин поддерживают целостность клеточных систем путем регулирования их окислительно-восстановительных процессов и детоксикации вредных соединений, включая свободные радикалы и активный кислород ^{1,2}. *L*-Цистин ((*R,R*)-3,3'-дитиобис-2-аминопропионовая кислота) входит в состав белков и пептидов и образуется при окислении содержащихся остатков цистеина ((*R*)-2-амино-3-меркаптопропионовая кислота).

Производные цистеина, например, *N*-ацетил-*L*-цистеин, широко используются для ле-

A new method of sulphur containing amino acids isomers – *D*-cystine and 3,3'-dimethyl-*D*-cystine from *D*-serine and *D*-threonine via halogen containing amino acids – β -chloro-*D*-alanine and α -amino- β -chloro-*D*-butyric acid – is developed. The method may be utilized as a convenient laboratory process for *D*-cystine, 3,3'-dimethyl-*D*-cystine or 3,3-dimethyl-cystine production, the benefits of which include simplicity, reagents availability and no need of protective groups supplementation. Yield of β -chloro-*D*-alanine (αR , βS)- α -amino- β -chlorobutyric acid exceeds 50%, that of *D*-cystine – 79%, and of 3,3-dimethyl-*D*-cystine – not less than 55%.

Key words: *D*-alanine; α -amino- β -chloro-*D*-butyric acid; amino acids; β -chloro-*D*-serine; *D*-cystine; 3,3'-dimethyl-*D*-cystine; synthesis; *D*-threonine.

чения хронических заболеваний, связанных с обструкцией дыхательных путей и хронических бронхитов ^{3,4}. *N,N*-Дизамещенные гидразиды цистеина обладают цитостатической активностью и могут быть использованы в качестве противоопухолевых препаратов ⁵.

Высокая биологическая активность метилированных производных цистеина также известна. Так, метиллантионин (2*R*-*S*-(2*S*,3*S*)-3-метилаланин-Зил]цистеин) – нестандартная серосодержащая аминокислота, является компонентом пептидных антибиотиков субтилина ^{6,7} и низина ⁸, а также присутствует в дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*) ⁹. Эта же аминокислота обнаружена в составе пептидного ингибитора ангиотензинпревращающего фермента – анковенина.

Дата поступления 23.11.20

Фрагментом метилантионина является остаток трео-3-метил-*D*-цистеина ((2*S*,3*S*)-2-амино-3-меркаптобутановая кислота), окисленной формой которого 3,3'-диметил-*D*-цистин ¹⁰.

Таким образом, важной задачей органического синтеза является поиск новых способов получения энантимеров цистеина и его производных.

В первом синтезе *L*-цистина Фишером в качестве исходного вещества был использован *L*-серин ¹¹.

Дю Виньо разработал метод синтеза *D,L*-цистина на основе натрийфталимидомалонового эфира (1) и бензилтиометилхлорида (2) ¹² (схема 1).

Необходимый для этого синтеза бензилтиометилхлорид получают из бензилмеркаптана. Гидролизом *S*-бензилтиометилфталимидомалонового эфира (3) был получен *S*-бензил-*D,L*-цистеин (4), а бензильная группа отщеплялась металлическим натрием в жидком аммиаке с образованием *D,L*-цистеина. Окислением *D,L*-цистеина кислородом воздуха был получен *D,L*-цистин (5).

В другом синтезе ¹³ *D,L*-цистин синтезирован из метилового эфира *D,L*-серина гидрохлорида (6) с PCl_5 в хлороформе с получением интермедиата — β -хлор-*D,L*-аланина гидрохлорида (7) и бензилмеркаптана (8) полученного с помощью реакции бензилхлорида магния с элементарной серой (схема 2).

При гидролизе продукта реакции был получен *D,L*-бензилцистин (4). Бензильная группа отщеплялась металлическим натрием в жидком аммиаке. Окислением *D,L*-цистеина кислородом воздуха был получен *D,L*-цистин (5).

Синтез метилированного производного *D*-цистина — 3,3'-диметил-*D*-цистина и трео-3-метил-*D*-цистеина ((2*S*,3*S*)-2-амино-3-меркаптобутановая кислота) из треонина описан в ^{10,14}.

В синтезе из *D*-треонина (9) ¹⁴ использовали тиобензойную кислоту для синтеза 3,3'-диметил-*D*-цистина. Из метилового эфира *N*-третил-*D*-треонина (10) было получено производное азиридина — метиловый эфир (2*R*,3*R*)-1-третил-3-метил-2-азиридинкарбоновой кислоты (11), затем метиловый эфир (2*R*,3*R*)-1-бензилоксикарбонил-3-метил-2-азиридинкарбоновой кислоты (12), а продуктом его реакции с тиобензойной кислотой в присутствии BF_3 был *S*-бензоил-*N*-бензилоксикарбонил-трео-3-метил-*D*-цистеина метиловый эфир (13) и сопутствующее *N*-бензилоксикарбонил-*O*-тиобензоил-*D*-треонина (14) как побочный продукт. Образование *S*-ацил и *O*-ацил производных объясняется существованием возможного равновесия в тиобензойной кислоте: $\text{C}_6\text{H}_5\text{COSH} \leftrightarrow \text{C}_6\text{H}_5\text{CSOH}$, хотя более высо-

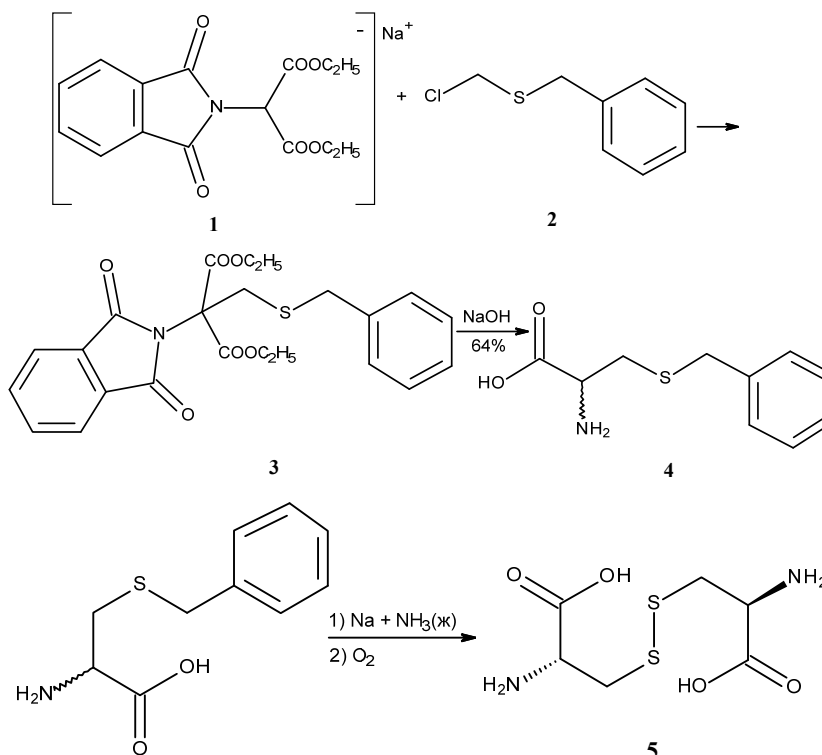


Схема 1. Синтез *D,L*-цистина на основе натрийфталимидомалонового эфира

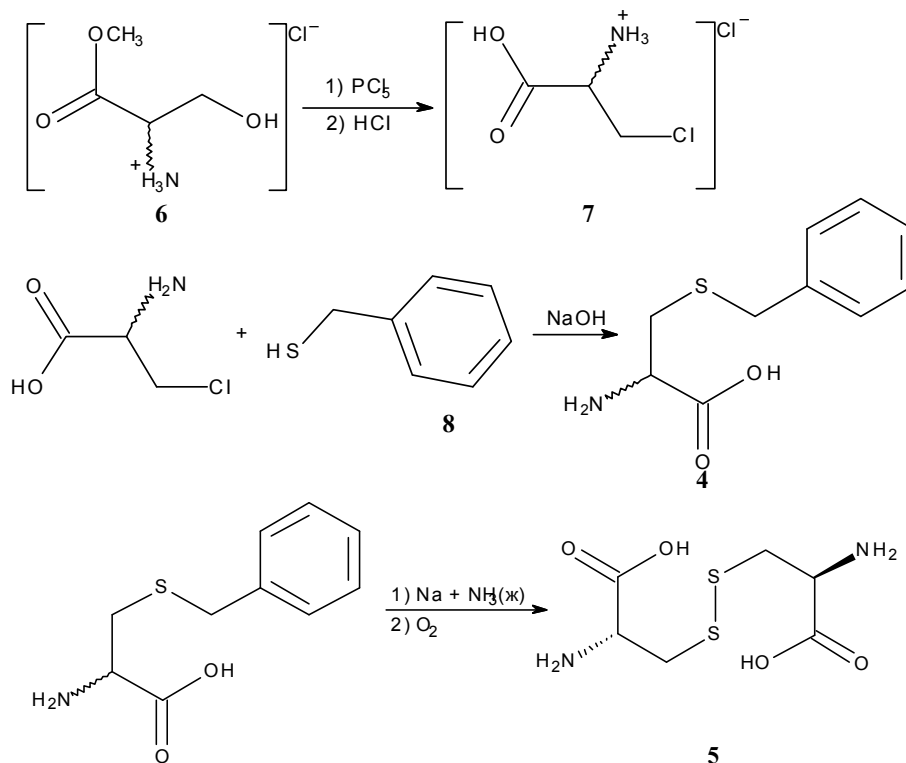


Схема 2. Синтез *D,L*-цистина на основе β -хлор-*D,L*-аланина и бензилмеркаптана

кая реакционная способность последней приводила к преимущественно к генерации S-ацилов — целевого продукта. Бензильная группа была удалена с помощью метиламина в метаноле и N,N'-бисбензоилоксикарбонил-3,3'-диметил-*D*-цистина метиловый эфир (15) был окислен и гидролизован с образованием дисульфида аминокислоты — 3,3'-диметил-*D*-цистина (16) (схема 3).

Данный синтез может быть использован для синтеза аминокислот *D*-цистеина и *D*-цистина, которые являются коммерчески дорогими препаратами.

В целом, известные синтезы требуют на последних стадиях использования жидкого аммиака, металлического натрия и низкой температуры ($-78\text{ }^\circ\text{C}$), или наличия защитных групп, что также усложняет синтез.

Материалы и методы исследования

Хроматографические тесты проводили на пластинах «Sorbfil» (ООО «ИМИД») методом восходящей ТСХ. После элюирования в системе растворителей изопропиловый спирт — 25% аммиак (7 : 3) и высушивания пластины пятна *D*-цистина и 3,3'-диметил-*D*-цистина обнаруживали опрыскиванием 0.5% раствором нингидрина в изопропиловом спирте.

Анализ чистоты *D*-цистина и 3,3'-диметил-*D*-цистина проводили методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель

105М» фирмы «Люмекс» (Россия) без дериватизации в боратном буфере по собственному поглощению аминогрупп (детектирование при длине волны 190 нм) ¹⁵.

Спектры ЯМР ^1H записаны на спектрометре Varian 400, с рабочими частотами 400 МГц.

Элементный анализ выполняли на приборе «vario El cube» (Elementar Analysensysteme, Германия).

Углы вращения измеряли на поляриметре СМ-3 (Россия).

Результаты и их обсуждение

Наиболее простым и перспективным способом получения изомеров и метилированных производных цистеина/цистина является синтез из *D* и *L*-изомеров серина и треонина и элементарной серы — доступных исходных веществ. Наибольший интерес представляет синтез *D*-изомеров аминокислот, так как *L*-изомеры цистина доступны из природного сырья.

Необходимым этапом синтеза, является получение хлорпроизводных *D*-серина (17) и *D*-треонина (9): β -хлор-*D*-аланина и (αR , βS)- α -амино- β -хлормасляной кислоты, по результатам которого был получен патенты ^{16,17}. Его достоинством является отсутствие защитных групп у аминокислот, использование недорогого и доступного реактива — тионилхлорида, а в качестве растворителя — диоксана (схема 4).

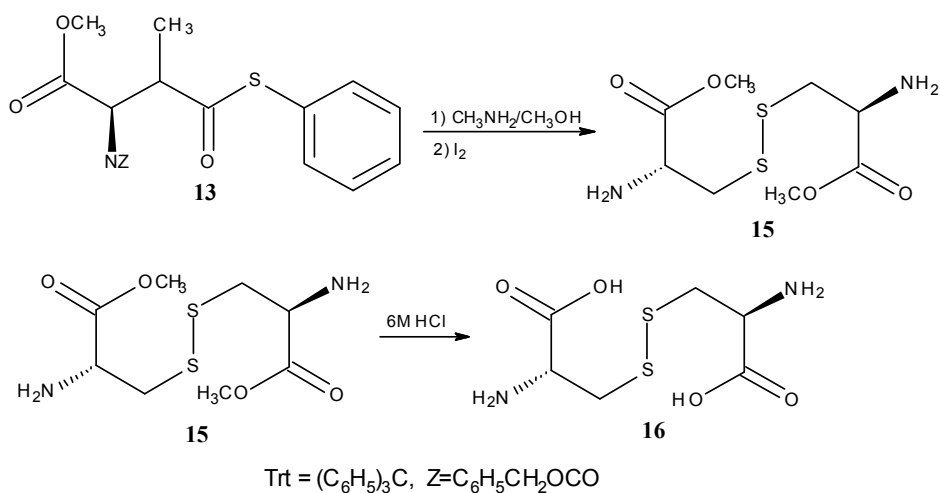


Схема 3. Синтез 3,3'-диметил-*D*-цистина из *D*-треонина

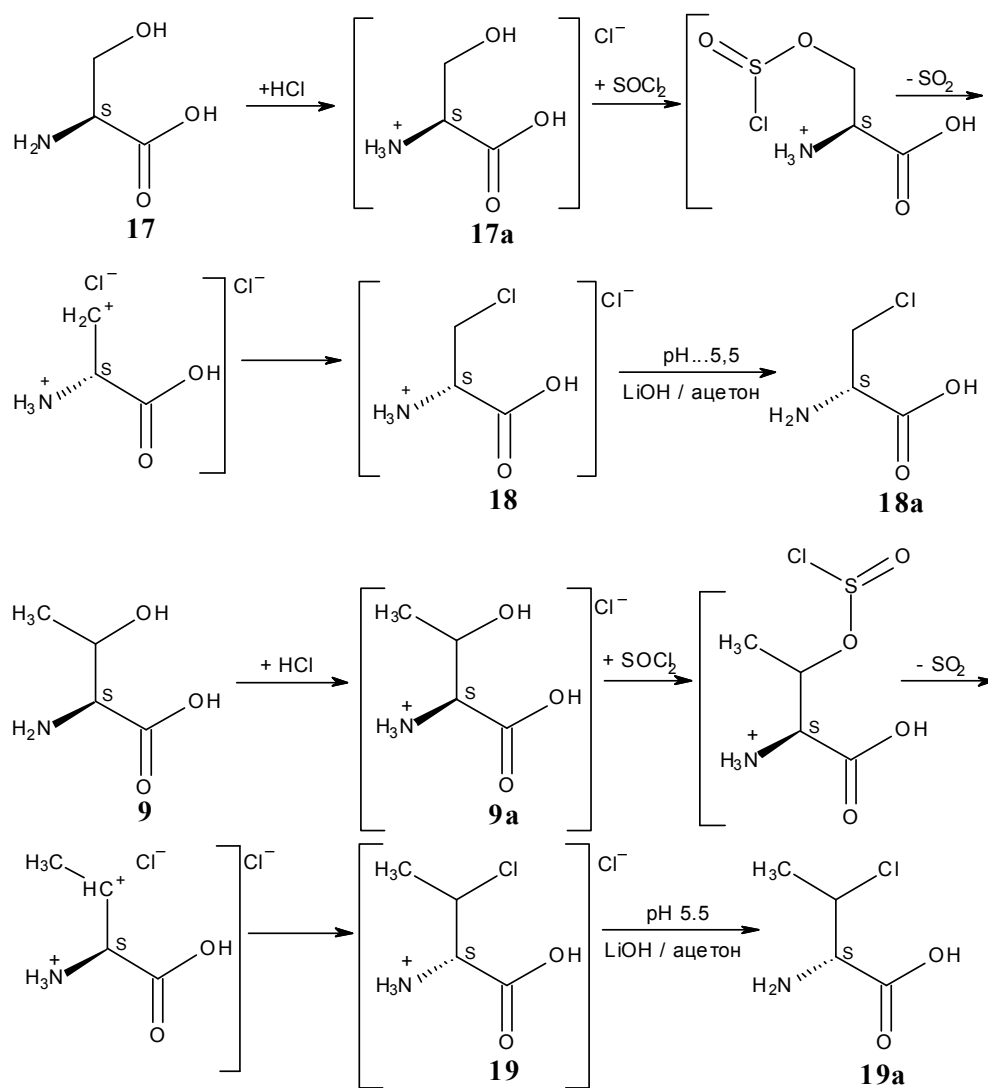


Схема 4. Синтез β -хлор-*D*-аланина и $(\alpha R, \beta S)$ - α -амино- β -хлормасляной кислоты из *D*-серина и *D*-треонина

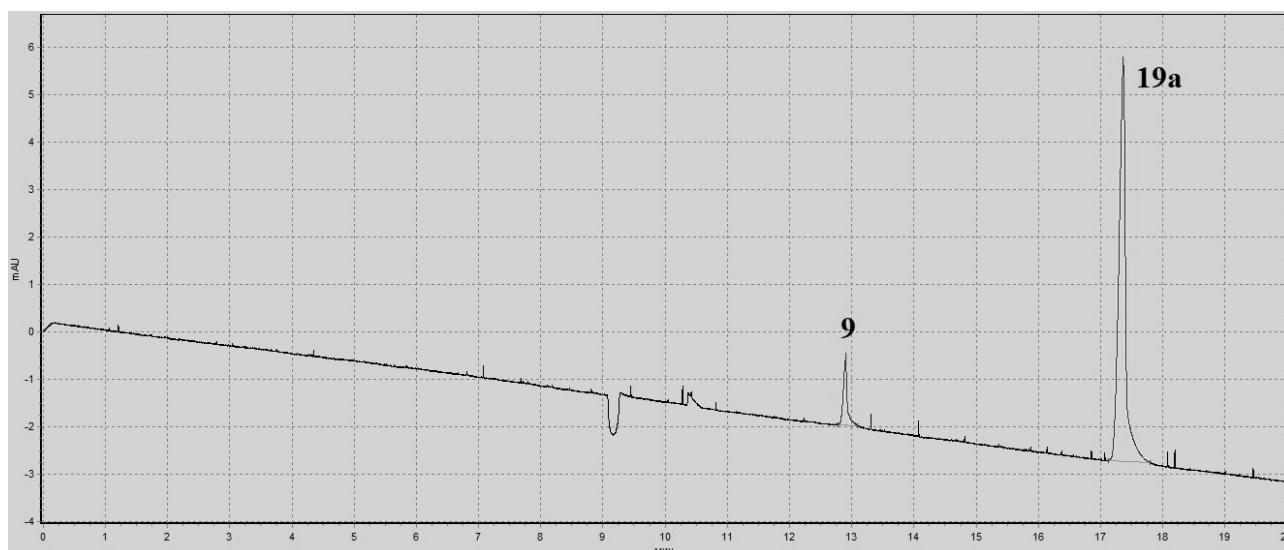


Рис. 1. Электрофореграмма $(\alpha R, \beta S)$ - α -амино- β -хлормасляной кислоты **18**

При действии тионилхлорида на *D*-серин/*D*-треонин реакция идет по S_Ni механизму, и β -хлор-*D*-аланин (**6**) / $(\alpha R, \beta S)$ - α -амино- β -хлормасляная кислота (**18**) получают в индивидуальном состоянии, в виде гидрохлорида, поскольку другие продукты реакции газообразны.

Образовывающийся осадок гидрохлорида β -хлор-*D*-аланин и $(\alpha R, \beta S)$ - α -амино- β -хлормасляной кислоты **10c** затем переосаждали путем добавления насыщенного раствора гидроксида лития до pH 5.5 и осаждением ацетоном с получением индивидуальных веществ — β -хлор-*D*-аланина и $(\alpha R, \beta S)$ - α -амино- β -хлормасляной кислоты **10a**. Выход β -хлор-*D*-аланина, $(\alpha R, \beta S)$ - α -амино- β -хлормасляной кислоты составляет не менее 50%. Анализ методом капиллярного электрофореза (КЭФ) показал чистоту не менее 95 %. Угол вращения плоскости поляризации $(\alpha R, \beta S)$ - α -амино- β -хлормасляной кислоты составляет: $[\alpha]^{20}_D = -19 \pm 3^\circ$, $c = 1$.

Для получения водного раствора дисульфида натрия (Na_2S_2) элементную серу восстанавливали борогидридом натрия при комнатной температуре. Лучшим растворителем, который не приводит к быстрому разложению борогидрида натрия и больше подходит для синтезов органических соединений с элементной серой, является этиловый спирт.

В нашем синтезе был использован спирт-ректификат и LiOH для связывания избытка выделяющегося сероводорода. Для соблюдения стехиометрии реакции на первом этапе был получен гидросульфид натрия (NaHS), после прекращения газообразования добавлением эквивалентного количества элементной серы получили дисульфид натрия (Na_2S_2) (схема 5).

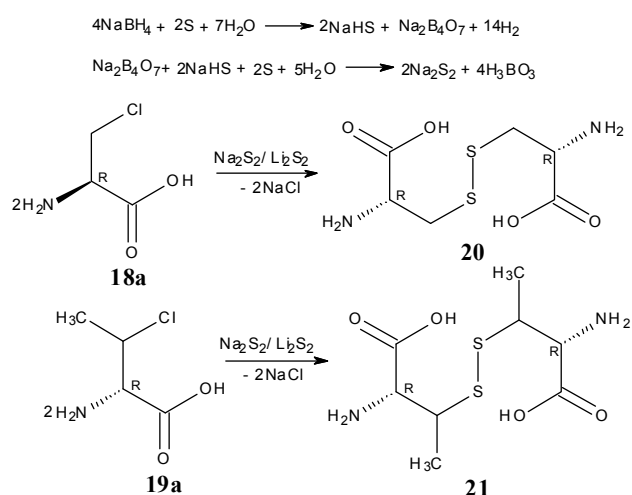


Схема 5. Синтез *D*-цистина и 3,3'-диметил-*D*-цистина из β -хлор-*D*-аланина и α -амино- β -хлор-*D*-масляной кислоты.

Для получения *D*-цистина/3,3'-диметил-*D*-цистина раствор β -хлор-*D*-аланина (**19**)/ α -амино- β -хлор-*D*-масляной кислоты (**20**) доводили до pH 9.0 насыщенным раствором LiOH, а затем добавляли в раствор дисульфида натрия и перемешивали в течение 12–14 ч. Раствор подкисляли до pH 2.0, фильтровали для удаления остатков элементной серы, затем подщелачивали до pH 8.0 и барботировали воздухом в течение нескольких часов для окисления цистеина до цистина и удаления остатков сероводорода. Снова подкисляли до pH 2.0 и доводили до pH 5.03 — изоэлектрической точки *D*-цистина. Выпавшие белые кристаллы цистина отфильтровывали и промывали охлажденной дистиллированной водой. Выход *D*-цистина составляет не менее 79%, с чистотой не менее 98% (TCX). В отличие от *D*-цистина,

осаждение которого из реакционной среды достигалось изменением рН, 3,3'-диметил-*D*-цистин оказался гораздо лучше растворим в воде. Для его выделения и очистки рН раствора доводили до рН 2.0 соляной кислотой, полученный раствор пропускали через хроматографическую колонку с катионитом КУ-2-8 в H^+ -форме и конечный продукт элюировали раствором аммиака. Раствор концентрировали в вакууме и доводили до рН 6.2 раствором HCl. Осаждение аминокислоты из охлажденного раствора проводили избытком метанола (1:7) с добавлением 1–2 % диэтилового эфира для снижения растворимости аминокислоты. Осадок промывали охлажденной смесью метанола и диэтилового эфира и высушивали в эксикаторе над молекулярными ситами 4Å. Выход

3,3-диметил-*D*-цистина составляет не менее 55%, чистотой не менее 95% (ТСХ).

Спектр ^1H -ЯМР (δ , м. д.) CH₃1.31. (3H, д., J 8 Гц, CH), 3.58-3.64 (1H м, CH (CH–NH³⁺)), 4.06. (1H, д, J 7.25 Гц). Элементный анализ: найдено, %: С 35.32; Н 6.18; N 10.10; S 23.70 % C₈H₁₆N₂O₄S₂; вычислено, %: С 35.8%; Н 6.0%; N 10.4%; S 23.9%. Угол вращения плоскости поляризации (α_R , β_S)- α -амино- β -хлормасляной кислоты составляет $[\alpha]^{20}_D = -414 \pm 3^\circ$.

Новый способ получения энантиомеров цистеина и его производных может быть использован удобный лабораторный синтез как аминокислоты *D*-цистина, доступной коммерчески, так и 3,3'-диметил-*L*-цистина и 3,3-диметил-*D*-цистина.

Литература

1. Бартон Д., Оллис У.Д. Общая органическая химия.— М.: Химия, 1986.— Т.10.— 704 с.
2. Северин Е.С. Биохимия.— М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006.— 784 с.
3. Mereto G.C., Balestra L., Henriquet F. Alveolar surfactant in lungs of operated patients after acetylcysteine treatment // *Eur. J. Respir. Dis.*— 1980.— V.61.— Pp.160-161.
4. Boman G., Backer U., Larsson S., Melander B., Wahlander L. Oral acetylcysteine reduces exacerbation rate in chronic bronchitis: report of a trial organized by the Swedish Society for Pulmonary Diseases // *Eur. J. Respir. Dis.*— 1983.— V.64.— №6.— Pp.405-415.
5. А.с. №983125 СССР. N,N-дизамещенные гидразиды цистина, обладающие противоопухолевой активностью / Алексиев Б.В., Стоев С.Б., Спасов А.В., Манева Л.С., Емануилов Е.А., Голвинский Е.В // Б.И.— 1982.— №47.
6. Alderton G.A. New Sulfur-containing Amino Acid from Subtilin // *J. Am. Chem. Soc.*— 1953.— V.75.— Pp.2391-2392.
7. Gross E., Kiltz H.H., Nebelin E. Die Struktur des Subtilins // *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*— 1973.— V.354.— Pp.810-812.
8. Gross E. Morell J.L. Structure of nisin // *J. Am.Chem. Soc.*— 1971.— V.93.— Pp.4634-4635.
9. Downey P.F., Black S. A new naturally occurring isomer of β -methyllanthionine // *J. Biol. Chem.*— 1957.— V.228.— Pp.171-179.
10. Kido Y., Hamakado T., Yoshida T., Anno M., Motoki Y., Wakamiya T., Shiba T. Isolation and characterization of ancovenin, a new inhibitor of angiotensin I converting enzyme, produced by actinomycetes // *J. Antibiot.*— 1983.— V.36.— Pp.1295-1299.
11. Fischer E., Packe K. Verwandlung des *l*-serin in *d*-alanin // *Chem. Ber.*— 1907.— V.40.— Pp.3717-3724.
12. Loring H.S., Vigneaud V.D. The isolation of two isomeric inactive cysteines // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*— 1931.— V.29.— Pp.41-42.

References

1. Barton D., Ollis U.D. *Obschaya organicheskaya khimiya* [General organic chemistry]. Moscow, Khimiya Publ., 1986, vol.10, 704 p.
2. Severin E.S. *Biokhimiya* [Biochemistry]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2006, 784 p.
3. Mereto G.C., Balestra L., Henriquet F. [Alveolar surfactant in lungs of operated patients after acetylcysteine treatment]. *Eur. J. Respir. Dis.*, 1980, vol.61. pp.160-161.
4. Boman G., Backer U., Larsson S., Melander B., Wahlander L. [Oral acetylcysteine reduces exacerbation rate in chronic bronchitis: report of a trial organized by the Swedish society for pulmonary diseases]. *Eur. J. Respir. Dis.*, 1983, vol.64, no.6, pp.405-415.
5. Aleksiev B.V., Stoev S.B., Spasov A.V., Maneva L.S., Emanuilov E.A., Golovinski E.V. *N,N-dizameshchennye gidrazidy tsistina, obladayushchie protivopukhlevoy aktivnost'yu* [N,N-disubstituted cystine hydrazides with antitumor activity]. Certificate of authorship USSR no.983125, 1982.
6. Alderton G.A. [New Sulfur-containing Amino Acid from Subtilin]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, vol.75, pp.2391-2392.
7. Gross E., Kiltz H.H., Nebelin E. [Die struktur des subtilins]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, 1973, vol.354, pp.810-812.
8. Gross E. Morell J.L. [Structure of nisin]. *J. Am.Chem. Soc.*, 1971, vol.93, pp.4634-4635.
9. Downey P.F., Black S. [A new naturally occurring isomer of β -methyllanthionine]. *J. Biol. Chem.*, 1957. vol.228, pp.171-179.
10. Kido Y., Hamakado T., Yoshida T., Anno M., Motoki Y., Wakamiya T., Shiba T. [Isolation and characterization of ancovenin, a new inhibitor of angiotensin I converting enzyme, produced by actinomycetes]. *J. Antibiot.*, 1983, vol.36, pp.1295-1299.
11. Fischer E., Packe K. [Verwandlung des *l*-serin in *d*-alanin]. *Chem. Ber.*, 1907, vol.40, pp.3717-3724.

13. Wood J.L., Middlesworth V.L. Preparation of cystine from radioactive sulfur // *J. Biol Chem.*— 1949.— V.179, №2.— Pp.529-533.
14. Wakamiya T., Shimbo K., Shiba T., Nakajima K., Neya M., Okawa K. Synthesis of threo-3-methylcysteine from threonine // *Chem. Soc. Jap.*— 1982.— V.55, №12.— Pp.3878-3881.
15. М-04-38-2009. Методика определение протеиновых аминокислот в кормах и сырье.— СПб.: ООО «Люмэкс-маркетинг», 2014.— 49 с.
16. Пат. № 2633542 РФ. Способ получения биологически активного вещества β -хлор-*L*-аланина / Полубояринов П.А. // Б.И.— 2017.— №29.
17. Пат. № 2669771 РФ. 3,3-диселено-бис-2-аминомасляная кислота и способ ее получения / Полубояринов П.А. // Б.И.— 2018.— №29.
12. Loring H.S., Vigneaud V.D. [The isolation of two isomeric inactive cysteines]. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1931, vol.29, pp.41-42.
13. Wood J.L., Middlesworth V.L. [Preparation of cystine from radioactive sulfur]. *J. Biol Chem.*, 1949, vol.179, no.2, pp.529-533.
14. Wakamiya T., Shimbo K., Shiba T., Nakajima K., Neya M., Okawa K. [Synthesis of threo-3-methylcysteine from threonine]. *Chem. Soc. Jap.*, 1982. vol.55, no.12, pp.3878-3881.
15. *Metodika opredeleniya proteinogennykh aminokislot v kormakh i syr'e* [Method for determination of proteinogenic amino acids in feed and raw materials]. St. Petersburg, Lumex Marketing Publ., 2014, 49 p.
16. Poluboyarinov P.A. *Sposob polucheniya biologicheskii aktivnogo veshchestva β -khlora-L-alanina* [Method of obtaining biologically active substance β -chloro-*L*-alanine]. Patent RF no.2633542, 2017.
17. Poluboyarinov P.A. *3,3-diseleno-bis-2-aminomaslyanaya kislota i sposob ee polucheniya* [3,3-diseleno-bis-2-aminobutyric acid and method for its preparation]. Patent RF no.2669771, 2018.