

**Ереванский государственный университет**

**Институт фармации**

**«ФАРМАЦИЯ» ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА**

**Кузубова Елена Валерьевна**

# **ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

**Асимметрический синтез  
гетероциклически замещенных  
производных (S)- аланина и их  
биологический скрининг**

**Երևան 2021**

**Студент`** \_\_\_\_\_  
подпись

---

ФИО

**Руководитель`** \_\_\_\_\_  
подпись

-  
-  
уч. степень, должность ФИО

**«Разрешаю защиту»**

**Зав.кафедры`** \_\_\_\_\_  
подпись

---

уч. степень, должность ФИО

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Литературный обзор.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Актуальность и прикладное значение небелковых аминокислот.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Методы асимметрического синтеза небелковых аминокислот.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Биомиметический синтез аминокислот.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Скрининг целевых амминокислот на антибактериальную активность.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Постановка задачи и выбор объектов исследования.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Обсуждение результатов.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Синтез исходных аминокислотных и дегидроаминокислотных синтонов.....</b>	<b>19</b>
<b><i>3.1.1. Синтез хирального Ni<sup>II</sup> комплекса оснований Шиффа глицина с и (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофеноном.....</i></b>	<b>19</b>
<b>3.2. Асимметрические реакции присоединения по Михаэлю гетероциклических производных индола к активной C=C связи дегидроаланина в хиральном комплексе Ni<sup>II</sup> [(S)-BPB-Δ-Ala].....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Биологический скрининг 2-амино-3-(2-метил-1H-индол-1-ил)- пропановой кислоты и 2-амино-3-(3-метил-1H-индол-1-ил)- пропановой кислоты.....</b>	<b>23</b>
<b>4. Экспериментальная часть.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Приборы, материалы и реагенты.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Синтез исходных соединений.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3. Асимметрический синтез β-замещенных аналогов аланина .....</b>	<b>27</b>
<b><i>4.3.1. Асимметрическое нуклеофильное присоединение 3- метилindle к двойной C=C связи комплекса [(S)-BPB-Δ- Ala]Ni(II).....</i></b>	<b>27</b>

<b>4.3.2. Асимметрическое нуклеофильное присоединение 2-метилнда к двойной C=C связи комплекса [(S)-BPB-Δ-Ala]Ni(II).....</b>	<b>27</b>
<b>4.4. Разложение полученных комплексов и выделение целевых аминокислот.....</b>	<b>29</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>31</b>
<b>Литература.....</b>	<b>32</b>

## ВВЕДЕНИЕ

За последние годы потребность в значительных количествах  $\alpha$ -аминокислот возрасла в связи с широким использованием их в биотехнологии, медицине, пищевой промышленности, микробиологии и других областях науки и техники. Если в прошлом потребности могли быть удовлетворены путем выделения их из гидролизатов белков или из других природных источников, то со второй половины 20-ого века интенсивно развиваются синтетические направления получения  $\alpha$ -аминокислот [1].

Одним из актуальных направлений последних десятилетий - получение небелковых  $\alpha$ -аминокислот в виду их широкого спектра применения как в медицина [2], так и в биотехнологии [3].

В связи с этим, асимметрический синтез хиральных биологически активных соединений с заданной абсолютной конфигурацией атомов углеродного скелета - является одной из ведущих направлений синтеза небелковых  $\alpha$ -аминокислот. Внимание, уделяемое получению  $\alpha$ -аминокислот в энантиомерно чистой форме, привлекает все больше внимание и занимает особое место в современной биоорганической химии. Это связано с их использованием в различных областях медицины [4], фармакологии [5], пищевой промышленности [6], в сельском хозяйстве и т.д.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы является асимметрический синтез новых энантиомернообогащенных индолсодержащих аналогов  $\alpha$ -аланина и их медико-биологических скриннинг.

Достижение поставленной цели предусматривает решение следующих задач:

- синтез исходных хиральных комплексов иона  $Ni^{2+}$  их оснований Шиффа с глицином и дегидроаланином.
- исследования реакций асимметрического присоединения по Михаэлю нуклеофилов к электрофильной  $C=C$  связи дегидроаланина в хиральном  $Ni^{2+}$  комплексе его основания Шиффа

с **(S)-BPB** с образованием  $\beta$ -замещенных  $\alpha$ -аминокислот (производных  $\alpha$ -аланина).

- Медикобиологический скриннинг полученных  $\beta$ -замещенных аналогов  $\alpha$ -аланина

## 1. Литературный обзор

### 1.1. Актуальность и прикладное значение небелковых аминокислот

Аминокислоты небелкового происхождения достаточно широко распространены в природе. На сегодняшний день известно более 700 небелковых  $\alpha$ -аминокислот [7]. Под термином «небелковые» подразумевают аминокислоты, их амиды, иминокислоты, не входящие в состав белков. В сущности, к небелковым аминокислотам относятся функционально замещенные производные белковых аминокислот с различными заместителями.

Небелковые аминокислоты образуются в организме животных, микроорганизмов и растений как конечные продукты вторичного метаболизма, или как промежуточные соединения, а также как результат метаболизма или детоксикации чужеродных соединений [8]. Чаще всего они образуются во время повышенной потребности в азоте (образование почек при прорастании семян) или же имеют свойство запасаться в виде растворимых веществ. Также многие аминокислоты, образовавшиеся при обмене веществ низших организмов, имеют свойство антибиотиков [9]. Они способны действовать подобно аминокислотам-антагонистам, т.е. являются конкурентными ингибиторами при обмене веществ, либо задерживают определенные ступени биосинтеза аминокислот, также способствуют образованию ложных последовательностей при биосинтезе белков.

В свою очередь, как и обычные аминокислоты, небелковые аминокислоты выполняют ряд функций в организме человека [10]:

- 1) участие в переносе ацилов (карнитин)
- 2) медиаторная (ГАМК)
- 3) участие в синтезе гормонов (ДОФА, 5-гидрокситриптофан)
- 4) участие в синтезе креатинфосфата (креатин)
- 5) участие в синтезе мочевины (орнитин, цитруллин)

Чаще всего встречаются азотосодержащие гетероциклы, хотя многие из них содержат кислород или серу в кольце. Ряд



азотосодержащих гетероциклических аминокислот, получаемый из триптофана, является замещенным в индольном ядре аналогами [11].

Учитывая все известные последовательности белков, триптофан является самой редкой из двадцати аминокислот, встречающихся лишь в 1% случаев [12]. Среди этих аминокислот только четыре обладают ароматическими боковыми цепями и только три из них представляют собой богатые электронами кольца. Имидазол в боковой цепи гистидина беден электронами. Фенилаланин и тирозин встречаются примерно в 4% и 3% случаев соответственно. Как и в гистидине (~2,5% встречаемости), индольная боковая цепь триптофана представляет собой азотсодержащий гетероцикл. Как тирозин, индол представляет собой донорную субъединицу водородной связи, то есть N-H, в дополнение к богатому электронами поведению гетероциклического кольца, которое может вовлекать его в различные супрамолекулярные взаимодействия. Эти особенности делают индольное кольцо триптофана редким, но очень особенным химическим каркасом для пептидов и белков [13].

Исследования последних лет показывают, что многие небелковые  $\alpha$ -аминокислоты входят в состав современных высокоактивных противораковых, гипертензивных и болеутоляющих препаратов, средств, применяемых для борьбы с алкогольной и наркотической зависимостью, и других важных фармакологических средств. Особое место среди них занимают  $\alpha$ -метилзамещенные  $\alpha$ -аминокислоты, которые, как специфические ингибиторы многих ферментов, способны необратимо связываться с активным центром ферментов ковалентной связью. Этот принцип применяется в биохимии и энзимологии для выяснения механизма действия ферментов.  $\alpha$ -замещенные  $\alpha$ -аминокислоты обладают мощной антигипертензивной и антисептической активностью, противоопухолевым и радиопротекторным действием. В частности, включение  $\alpha$ -метил-L-диоксифенилаланина в состав лекарственного препарата ДОФА [14] позволяет исключить нежелательные побочные процессы при лечении болезни Паркинсона,  $\alpha$ -метилтриптофан применяют при лечении стафилококковых инфекций,  $\alpha$ -метилтирозин является ингибитором

фермента тирозингидроксилазы, обуславливающего превращение тирозина в 3,4-диоксифенилаланин - важный промежуточный продукт биосинтеза адреналина [15].

Небелковые  $\alpha$ -аминокислоты применяются также в синтезе различных лекарственных препаратов. Так, сильный антибиотик Леуциностагин А, обладающий противоопухолевой активностью, содержит три остатка (*S*)- $\alpha$ -метиламинопропионовой кислоты. *O*-метил-L-треонин применяется для синтеза важного физиологически активного пептида 3-*O*-метилтреонинокситоцина.  $\beta$ -N-аминозамещенные производные аминокислот входят в состав антибиотиков Туберактиномицина, Блеомицина, Эдеина, Капреомицина, А-19003 и т.д. (*S*)-Замещенные цистеины применяются для синтеза цистеинсодержащих физиологически активных пептидов [16]. Включение *D-allo*-изолейцина в состав антибиотика Dactinomycin D придает препарату антиканцерогенную активность [17]. Симпатомиметический препарат N-карбоксифенилпролиллизин является составной частью антигипертензивного препарата Лизиноприл. Производные L-лизина, L-оксипролина и D-фенилаланина входят в состав противораковых препаратов [18] Leuprolide, Octreotide, Tuftsine и т.д.

Известно также, что введение в пептидную цепочку субстанции лекарственных препаратов вместо белковой  $\alpha$ -аминокислоты соответствующего небелкового аналога повышает устойчивость лекарства к расщеплению протеолитическими ферментами, что ведет в свою очередь к пролонгированию его действия [19]. К числу небелковых  $\alpha$ -аминокислот воздействующих на организм относятся  $\beta$ -галогеналанин, циклосерин, винилглицин и др.

Одним из перспективных радикалов для ввода в небелковую  $\alpha$ -аминокислоту является индол [20]. "Привилегированная структура" данного вещества является основание для открытия новых лекарственных кандидатов [21]. Также тот факт, что индольное ядро входит в состав алкалоидов, триптофана и растительных гормонов послужил толчком к массовым поискам производных индола, породив огромное количество биологически активных природных и

синтетических продуктов с обширным спектром применения и широким диапазоном терапевтических мишеней [22]: агонисты и антагонисты 5-гидрокситриптаминовых рецепторов, агонисты каннабиноидных рецепторов и ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы, модуляторы биорецепторов [23].

На сегодняшний день список препаратов, содержащих субструктуры аминокислоты триптофана и индола достаточно широк. Например, эрголины представляют собой класс производных индола, которые связываются с 5-HT<sub>1A</sub>-рецепторами [24]. Суматриптан был обнаружен среди сотни аналогов серотонина, все они были экранированы на изолированных кровеносных сосудах. Различные исследования подтвердили высокую степень селективности этого соединения для 5-HT<sub>1D</sub> рецепторов, практически не влияя на другие типы 5-HT рецепторов [25]. Соединение WIN-55,212-2 относится к классу аминоалкилиндолов и действует как мощный агонист рецепторов CB<sub>1</sub> и CB<sub>2</sub> с небольшим предпочтением CB<sub>2</sub>. Данный препарат сыграл важную роль в идентификации и характеристике каннабиноидных рецепторов и связанных с ними функций. В настоящее время WIN-55,212-2 используется в качестве радиолиганда CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> (Рис.1). Интересно отметить, что аминоалкилиндолы не имеют структурного отношения к каннабиноидам и были разработаны как нестероидные противовоспалительные препараты [26].

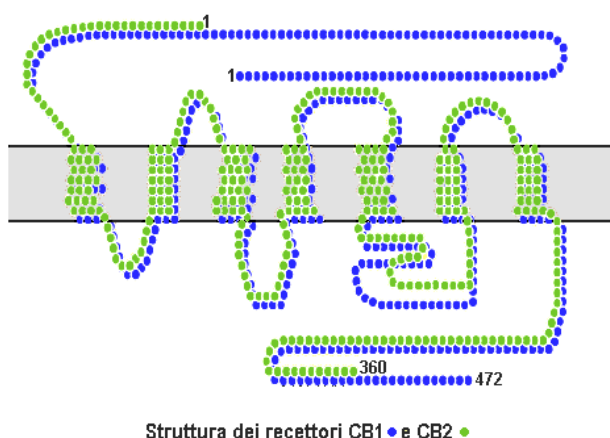


Рисунок- 1. Строение рецептора CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>.

## 1.2. Методы асимметрического синтеза небелковых аминокислот

Асимметрическим синтезом называется процесс, в котором прохиральная молекула или ее фрагмент превращается в хиральный с неравным количеством стереоизомерных продуктов [27].

В настоящее время используется следующая классификация асимметрического синтеза (таблица 1):

Таблица-1. Классификация асимметрического синтеза.

Асимметрический синтез (АС)			
Участие вспомогательного оптически активного вещества		Участие физического асимметризирующего агента	
		Катализ	

Вспомогательная оптически активная группа в превращаемом субстрате	Вспомогательная оптически активная группа в реагента	Вспомогательная оптически активный растворитель	Гомогенный	гетерогенный	Фотохимические синтезы с участием циркулярно-поляризованного света	Синтезы при участии других физических асимметризирующих факторов
Диастереоселективный АС				Энантиоселективный АС		

Также существует еще одно разделение ассимметрического синтеза (таблица2):

Таблица-2. Частвая классификация ассимметрического синтеза.

Ассимметрический синтез (АС)	
Частичный	Абсолютный
С участие оптически активного реагента	На оптически активном кварце
- Алифатические предельные	Фотохимические синтезы с участием циркулярно-поляризованного света
- Алифатические непредельные	
- Ароматические	
- Алициклические	Синтезы при участии других

- Гетероциклические	физических асимметрирующих факторов
---------------------	-------------------------------------

На данный момент абсолютный асимметрический синтез оказался неэффективным методом для получения оптически чистого продукта [28].

В настоящее время самым часто используемым способом для получения  $\alpha$ -аминокислот является метод асимметрического катализа. Синтез является каталитическим в том случае, когда в роли хирального индуктора выступает хиральный катализатор, участвующий в процессе в каталитических количествах (молярное соотношение катализатор/субстрат 1/100-1000). Также он сочетает в себе ряд преимуществ:

- 1) Использование недорогого сырья;
- 2) Проведение реакций в концентрированных растворах;
- 3) Воспроизводимость;
- 4) Легкость разделения реакционной смеси и выделение целевого продукта;
- 5) Отсутствие необходимости разделения полученных рацематов аминокислот на оптические антиподы;
- 6) Отсутствие рацемизации ненужного энантиомера.

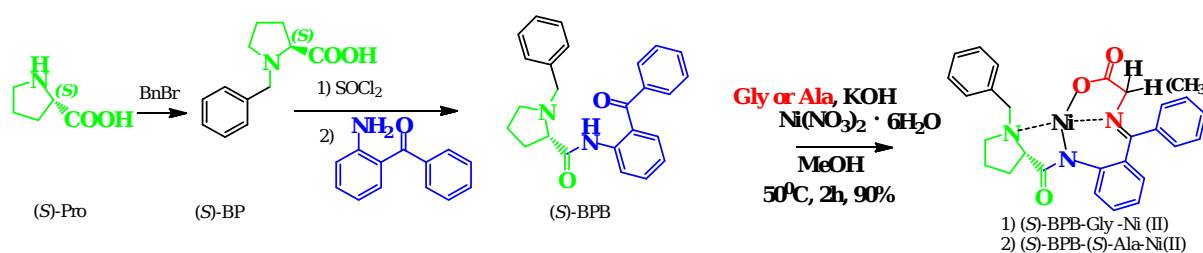
Эффективность асимметрического синтеза оценивается энантиомерной чистотой, а также её называют оптическим выходом или энантиомерным избытком продукта [29].

С практической точки зрения на сегодняшний день наиболее перспективным является диастереоселективный асимметрический синтез. В ходе данных реакций возникают диастереомеры, которые различаются физическими свойствами. Асимметрический синтез при этом может контролироваться как термодинамическими, так и кинетическими факторами. При термодинамически контролируемом асимметрическом синтезе соотношение образующихся диастереомеров определяется различием в энергии конечных состояний. А в кинетически контролируемом асимметрическом синтезе асимметрическое наведение осуществляется благодаря разным значениям энергий переходных состояний, а значит скоростью реакций их образования [30]. Современный органический синтез насчитывает

более нескольких десятков разновидностей методов диастереоселективных асимметрических синтезов. Мы же остановимся на рассмотрении одного наиболее значимого из них.

Эффективными субстратами для асимметрического синтеза аминокислот являются основания Шиффа, полученные из эфиров глицина и хиральных кетонов [31]. Установлено, что наиболее перспективным является метод координации аминокислотного фрагмента с ионом металла. Именно этот принцип лег в основу метода использованного Ю.Н. Белоконом и сотр., которые брали за основу комплексы  $Ni^{II}$  основания Шиффа с (S)- или (R)-2-[N-(N'-бензилпролил)амино]бензофеноном с глицином или аланином в реакциях асимметрического алкилирования. Синтезы хирального производного и комплексов  $Ni^{II}$  оснований Шиффа глицина и аланина на его основе приведены на схеме 1.

Схема 1. Синтез хирального реагента (S)-BPB и комплексов  $Ni^{II}$  его оснований Шиффа с аминокислотами



В синтезированных комплексах  $Ni^{II}$  присутствие аминокислотного фрагмента, обладающего высокой СН-кислотностью, позволяет использовать их в реакциях асимметрического алкилирования без использования сильных оснований (таких как BuLi, LDA). Комплексы вступают в реакцию с активированными и неактивированными алкилгалогенидами при комнатной температуре. При этом в качестве оснований используются гидроксиды натрия или калия, а также гидрид натрия или карбонат калия.

Необходимо подчеркнуть, что кроме ряда преимуществ экспериментального типа (простая методика алкилирования, не требующая использования сильных оснований, и инертной атмосферы), структура используемых комплексов обеспечивает высокую

стереоселективность в процессе алкилирования [32]. Благодаря тому, что центральный атом металла в комплексах имеет плоско-квадратную геометрию, хелатные кольца искажаются, и фенильная группа *N*-бензилпролинового фрагмента экранирует аминокислотный фрагмент со стороны *re* плоскости основания Шиффа, делая *si*-сторону плоскости более доступной для атаки алкилирующими агентами. И как результат обеспечивается высокая энантиоселективность >90%.

Данный метод синтеза аминокислот был модифицирован несколькими учеными. Например, *A.J. Blake* и соотр. исследовали стереодифференцирующие способности лигандов аналогичного строения, отличающихся лишь заместителями при атоме азота пролинового фрагмента [33]. Авторы использовали заместители, которые обеспечивают дополнительную координацию с центральным ионом металла в комплексах. Также метод модифицировал и *А. Попков*, предложив использовать комплексы NiII на основе другого реагента (*S*)-2-[*N*-(2,4,6-триметилбензил)пролиламино]бензофенона [34].

Из приведенной выше информации можно выделить, что метод, основанный на применении комплексов Ni<sup>II</sup> хиральных шиффовых оснований аминокислот с хиральными реагентами, в частности **(S)-BPB**, которые используются для синтеза наиболее широкого набора энантиомерно обогащенных аминокислот, имеет огромное преимущество в связи с простотой исполнения и доступностью реагентов, а также не требует экстремальных температурных режимов.

### 1.3. Биомиметический синтез аминокислот

Общеизвестно, что одной из нерешенных задач на сегодняшний день является осуществление асимметрического синтеза из прохирального предшественника точно также, как это делают ферменты на биологическом уровне, т.е. разработка биомиметического подхода. В настоящее время известно достаточно много хиральных индукторов, которые диастереотопно взаимодействуют с реагирующей молекулой и приводят к образованию асимметричного продукта [35].



В научной литературе представлены методы, использованные учеными для биомиметического подхода при синтезе аминокислот. Например, Иван Деведжев и соотр. предложили следующую интерпретацию процесса переноса карбоксильной группы в гидроксильную, которая в природе происходит на 3-углеродном атоме в рибозном цикле тРНК [36]. В лаборатории данную систему воспроизвели при помощи фосфорсодержащего соединения 2-гидроксипропилфосфоната, в котором заместители по фосфорильной части и особенно наличие вицинальной гидроксильной группы такие же, как и в 3-положении рибоза и в качестве фосфорилирующего реагента были использованы 2-гидроксиэфиры оксофосфорных кислот [37].

Также, в 1980 году группой японских ученых во главе с Sell1 Shinkai был разработан метод по замене биологической модельной реакции НАДН-зависимых ферментов, основанный на использовании неферментативно модельных соединений НАДН, которые используются для восстановления двойных связей. Что касается двойной связи C=N, то восстановление было достигнуто частично, в присутствии  $Mg^{2+}$  ион или основания Шиффа [38].

Помимо этого, в основе метода биомиметрического синтеза лежит ацилазный процесс. В этом процессе фермент избирательно гидролизует N-ацетил-L-аминокислоту до соответствующей L-аминокислоты, не касаясь D-субстрата.

Рацемические N-ацетилированные аминокислотные субстраты довольно легко доступны через ацетилирование D, L-аминокислот с ацетилхлоридом или ангидридом уксусной кислоты в щелочи в реакции Шоттена-Баумана или через амидокарбонилирование.

В природе же асимметрический синтез аминокислот осуществляют пиридоксальфосфат (ПФ) зависимые ферменты, которые во многом ответственны за метаболические превращения аминокислот в организме [39]. Принцип их действия в общих чертах известен и состоит в превращении аминокислоты в СН-кислоту при образовании ею основания Шиффа с ПФ-ом. Полученный карбанион претерпевает многочисленные асимметрические превращения, одним из которых

является конденсация с электрофилами, ведущая или к дейтерообмену, или к образованию новых С-С связей, если в качестве электрофила использовать альдегид. Этот принцип давно реализуется в химии для синтеза более сложных аминокислот из их простейших предшественников.

В природе ПФ-ферменты катализируют разрыв различных связей в молекуле аминокислоты и специфика каждого фермента определяет, какая именно связь аминокислоты разрывается или замещается [40]. К числу этих реакции относятся отрыв  $\alpha$ -Н аминокислоты с последующим С-алкилированием,  $\alpha,\beta$ -элиминирование  $\beta$ -окси- $\alpha$ -аминокислот с последующим присоединением к активной С=С связи дегидроаминокислот и т.д. [41]. Многие реакции синтеза  $\alpha$ -аминокислот в организме катализируются пиридоксальными ферментами  $\alpha,\beta$ - и  $\beta,\gamma$ -элиминирования и замещения. Механизм действия этих систем на примере синтеза  $\alpha$ -аминокислот с заместителями в  $\beta$ -положении на основании представлений физической органической химии и некоторых модельных исследований представлен на схеме 2.

Ключевой стадией этого синтеза является образование оснований Шиффа глицина с пиридоксалем на активном центре фермента, что приводит к увеличению СН-кислотности глицинового остатка и стабилизации системы за счет образования внутримолекулярных водородных связей. Конденсацией остатков альдегидов к фрагменту глицина образуется шиффовое основания  $\beta$ -окси- $\alpha$ -аминокислот, которые через промежуточное О-ацетилирование и  $\alpha,\beta$ -элиминирование остатка уксусной кислоты превращаются в Шиффовые основания дегидроаминокислот (дегидроаланина и дегидроаминомасляной кислоты). На следующем этапе происходит присоединение различных остатков к электрофильной С=С связи дегидроаминокислотного фрагмента с образованием шиффовых оснований  $\alpha$ -аминокислот, содержащих заместители в  $\beta$ -положении, гидролиз которых дает оптически активную аминокислоту и пиридоксальный фермент.

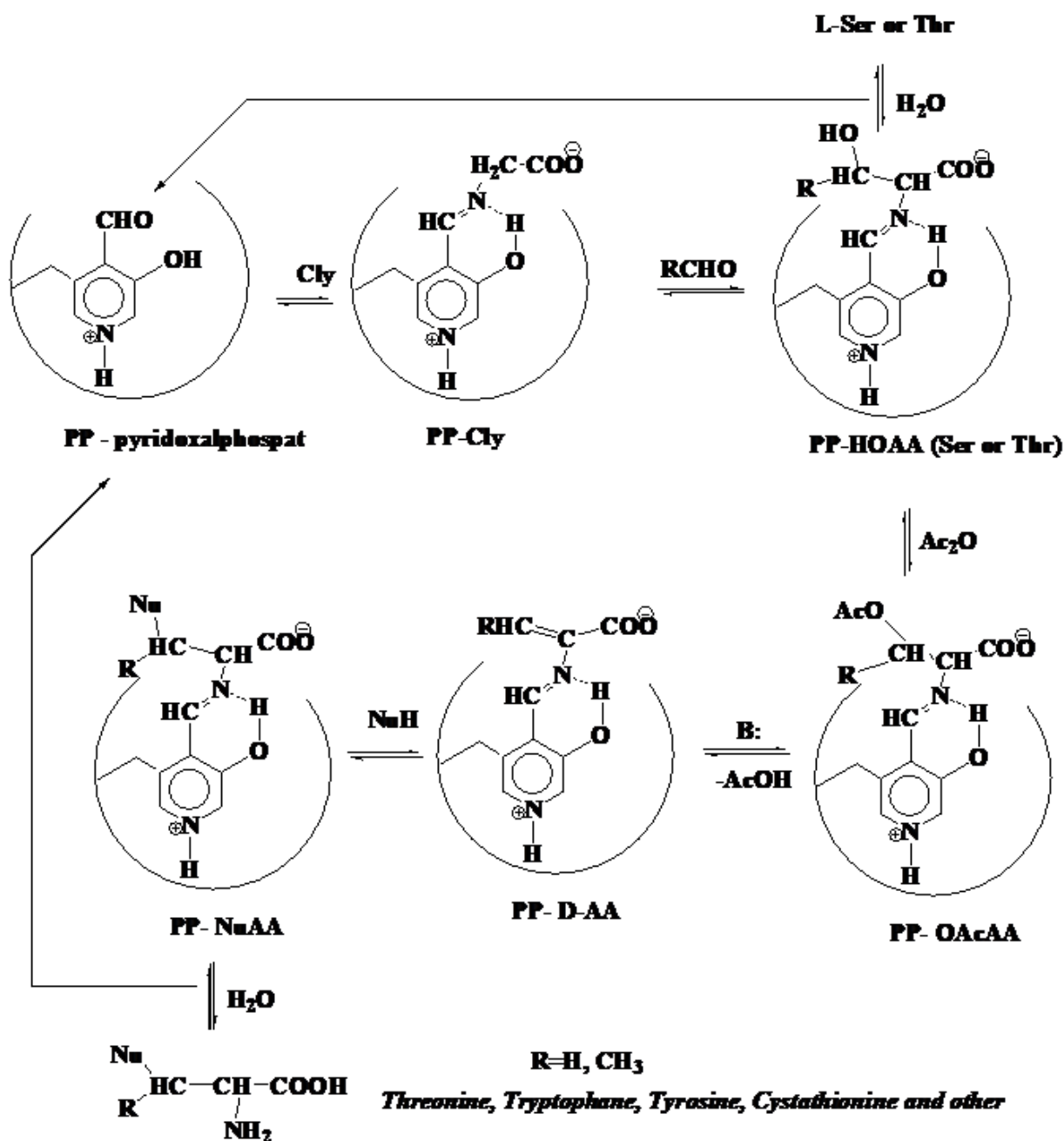
По этой схеме в организме синтезируются триптофан, цистеин, цистатион, треонин, тирозин и т.д. При этом хиральное окружение

активного центра фермента апоферментом обеспечивает 100% асимметрический синтез аминокислот L-абсолютной конфигурации [42].

Через образование оснований Шиффа между аминокислотой, содержащей электроотрицательный заместитель в  $\gamma$ -положении, и пиридоксалем на активном центре ферментов происходит  $\beta,\gamma$ -элиминирование и замещение, при котором происходит отрыв  $\beta$ -водорода и выброс электроотрицательной частицы. Образующая система основания Шиффа  $\beta,\gamma$ -дегидроаминокислоты принимает протон в  $\gamma$ -положении и превращается в систему оснований Шиффа  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислоты, которая, в свою очередь, претерпевает обычные превращения, описываемые схемой 2.

Предполагается, что полоса поглощения при 450-470 нм, возникающая в субстрат-ферментном комплексе  $\beta$ -элиминирующих ферментов, связана с хромофорной системой шиффовых оснований  $\alpha,\beta$ -дегидроаминокислот.

## **Схема 2**



Согласно общепринятой точке зрения, отрыв  $\alpha$  и  $\beta$  протонов происходит под действием основных групп, находящихся в активном центре ферментов. Наиболее вероятными кандидатами на эту роль являются  $\epsilon$ -аминогруппа лизинового фрагмента или имидазольная группа гистидинового остатка [43].

Исследованием ПФ-фермента занимались такие ученые как: Браунштейн А. Е., Шемякин М. М., Метцлер и Снелл [44]. После многолетних исследований они пришли к выводу, что для осуществления асимметрического биомиметического синтеза  $\beta$ -замещенных  $\alpha$ -аминокислот необходимо создать простые модельные

системы пиридоксальных ферментов, обладающих следующими свойствами:

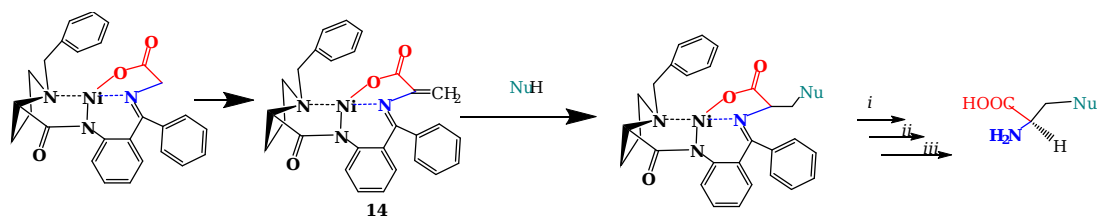
- химическая стабильность и стереохимическая инертность в реакциях аминокислотных превращений [45];
- высокая СН-кислотность аминокислотных и электрофильность дегидроаминокислотных фрагментов, что необходимо для осуществления реакции С-алкилирования и присоединения нуклеофилов;
- наличие высоких энантиоселективных эффектов, что необходимо для обеспечения стереоселективного протекания реакции [46, 47].

Оригинальными в области асимметрического биомиметического синтеза  $\beta$ -замещенных (*S*)- и (*R*)-  $\alpha$ -аминокислот являются работы Сагияна А.С. и сотрудников, основанные на использовании в качестве электрофильного дегидроаминокислотного синтона плоско-квадратных комплексов иона  $Ni^{2+}$  оснований Шиффа дегидроаланина с хиральным амидом (*S*)-пролина или (*R*)-пролина [48]. Эти нейтральные комплексы достаточно стабильны и обладают высокой электрофильностью двойной  $C=C$  связи дегидроаминокислотного фрагмента. Наличие высоких энантиоселективных эффектов в этих комплексах обеспечивают высокую стереоселективность при нуклеофильном присоединении дегидроаминокислотного остатка (см. схему 3).

По этой схеме были осуществлены асимметрические реакции присоединения аминов, тиолов и алколюлят ионов к электрофильной двойной  $C=C$  связи дегидроаминокислотных комплексов с образованием  $\alpha$ -замещенных цистеинов,  $\beta$ -N-аминозамещенных аланинов,  $\beta$ -замещенных производных аминокислотной кислоты и т.д. При этом, хиральные реагенты на основе (*S*)-пролина индуцируют асимметрический синтез аминокислот (*S*)-абсолютной конфигурации, а хиральные реагенты на основе (*R*)-пролина индуцируют асимметрический синтез аминокислот (*R*)-абсолютной конфигурации. Стереоселективность синтеза составляет в среднем 90%, что является следствием терминодинамической стабильности диастереоизомеров, содержащих (*S*)-аминокислоту в случае использования хирального реагента на основе (*S*)-пролина и диастереоизомеров, содержащих (*R*)-

аминокислоту в случае использования комплексов на основе хирального карбонильного производного (*R*)-пролина. После синтеза выделяют оптически активные аминокислоты и исходные хиральные реагенты [49]. При этом последние регенерируются с полным сохранением исходной хиральности и их можно использовать многократно в асимметрических реакциях превращения аминокислот.

### Схема 3



- 2MnCl<sub>2</sub>, 50°C (i); Dowex50(ii); crystallization (iii)

На основе проведенного обзора научной литературы нами было решено, что за основу асимметрического синтеза гетероциклически замещенных производных (*S*)- аланина будет взят метод асимметрического синтеза, основанный на использовании ***Ni(II)* комплекса основания Шиффа дегидроаланина с (*S*)-2-*N*-(*N'*-бензилпролил)аминобензофеноном** хиральном вспомогательном [50].

#### 1.4. Скрининг целевых аминокислот на антибактериальную активность

Эволюция и распространение антибиотикорезистентности стали одной из главных угроз для общественного здравоохранения во всем мире, а распространение граммотрицательных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ)-одной из главных проблем современности <sup>51</sup>.

*Stenotrophomonas maltophilia* является условно-патогенным нозокомиальным патогеном, ответственным за возникновение различных инфекций, с высокой заболеваемостью и смертностью, особенно у пациентов с сопутствующими патологиями, особенно такими как муковисцидоз и иммунодефицитного состояния. Одной из главных характеристик этой бактерии является её низкая восприимчивость к широкому спектру антибиотиков, что влечет за собой трудности в лечении вызываемыми инфекциями <sup>52</sup>.

Среди факторов, определяющих низкую восприимчивость *S. maltophilia* к антибиотикам, можно выделить низкую проницаемость ее мембраны, наличие в её геноме большое количество встроенных генов, которые кодируют устойчивость к антибиотикам-модифицирующих ферментов, хинолонов белка резистентности SmQnr и эффлюксные насосы, наибольшую значимость имеет принадлежность к семейству резистентно-нодуляционного-деления (RND) <sup>53</sup>. Также в своем геноме она имеет две внутренних бета-лактамазы, получившие название L19 и L210, но они не активны в отношении цефтазидима на том уровне, на котором они экспрессируются в нескольких клинических изолятах *S. maltophilia* 16-18. Кроме этого, было доказано, что мутанты, сверхэкспрессирующие бета-лактамазы L1 и L2 и обладают пониженной восприимчивостью к цефтазидиму. Также, недавние работы ученых показали, что *S. maltophilia* бета-лактамазо-сверхэкспрессирующие цефтазидим-резистентные мутанты, лишенные функционального MprI, часто отбираются в клиниках <sup>54</sup>.

В настоящее время для лечения инфекций *S. maltophilia* используется лишь несколько терапевтических комбинаций. Исходя из всего вышеперечисленного именно поиск ингибиторов данного микроорганизма является одной из актуальных проблем в медицине и фармации.

## 2. Постановка задачи и выбор объектов исследования

Анализ литературных данных показывает, что лучшим объектом для асимметрического синтеза  $\beta$ -замещенных  $\alpha$ -аминокислот является плоско-квадратный комплекс иона  $\text{Ni}^{\text{II}}$  основания Шиффа дегидроаланина с хиральным карбонильным соединением (*S*)-2-N-(*N*'-бензилпролил)аминобензофеноном ((*S*)-BPB). Комплекс дегидроаланина обладает активной электрофильной двойной  $\text{C}=\text{C}$  связью и легко подвергается нуклеофильному присоединению с образованием комплексов, с содержанием  $\beta$ -замещенных  $\alpha$ -аминокислотных фрагментов, при этом происходит высокоселективная конденсация по Михаэлю с образованием преимущественно диастереоизомерных комплексов  $\alpha$ -аминокислот (*S*)-абсолютной конфигурации. После разложения диастереоизомерно чистых комплексов выделяют оптически чистые  $\alpha$ -аминокислоты, а исходный хиральный реагент (*S*)-BPB при этом регенерируется с полным сохранением исходной хиральности, что позволяет его использовать многократно. Преимуществом данной технологии является также ее универсальность; она позволяет по одной технологической схеме с использованием одного и того же хирального реагента из самых простых и доступных белковых  $\alpha$ -аминокислот получить дорогие и важные небелковые  $\alpha$ -аминокислоты самого разного строения.

Следует отметить, что нуклеофильные присоединения дегидроаланина в указанном комплексе в основном протекает с количественными химическими выходами ( $\geq 90\%$ ).

В работе для достижения поставленной цели предполагается провести следующие исследования:

1. Синтез и выделение из реакционной смеси  $\text{Ni}^{\text{II}}$  комплексов основания Шиффа дегидроаланина с хиральными реагентами (*S*)-BPB ( $\text{Ni}^{\text{II}}$  [(*S*)-BPB- $\Delta$ -Ala]).
2. Подобрать оптимальные условия для асимметрической реакции присоединения по Михаэлю гетероциклических производных индола к активной  $\text{C}=\text{C}$  связи дегидроаланина в хиральном комплексе  $\text{Ni}^{\text{II}}$  [(*S*)-BPB- $\Delta$ -Ala].



3. Выделить целевые аминокислоты
4. Исследовать и установить структуру и абсолютную конфигурацию синтезированных небелковых  $\alpha$ -аминокислот и их промежуточных комплексов современными методами спектрального анализа.
5. Осуществить скриннинг полученных аминокислот

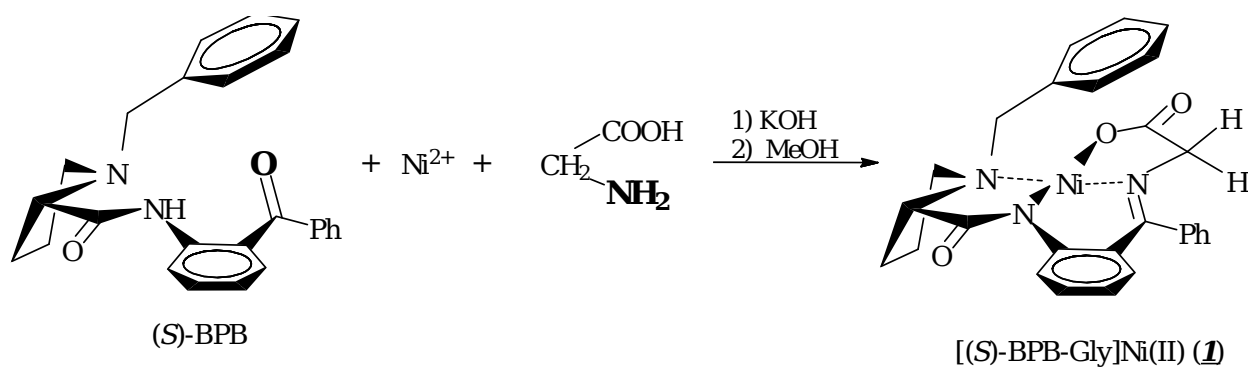
### 3. Обсуждение результатов

#### 3.1. Синтез исходных аминокислотных и дегидроаминокислотных синтонов

##### 3.1.1. Синтез хирального Ni<sup>II</sup> комплекса оснований Шиффа глицина с и (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофеноном

Хиральный комплекс иона Ni<sup>II</sup> с основанием Шиффа глицина и хирального карбонильного соединения (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофенона Ni<sup>II</sup>[(S)-BPB-Gly] (**1**) был синтезирован согласно ранее разработанной методике, взаимодействием глицина, Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O и (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофенона ((S)-BPB), в среде метанола в присутствии KOH (см. схему 4).

#### Схема 4



Физико-химические параметры синтезированного комплекса (R<sub>f</sub> на пластинках ТСХ, <sup>1</sup>H-ЯМР, элементный анализ, поляриметрические измерения) однозначно соответствуют литературным данным. Синтезированный комплекс Ni<sup>II</sup>[(S)-BPB-Gly] (**1**) и был использован для синтеза комплекса дегидроаланина. Выход комплекса Ni<sup>II</sup>[(S)-BPB-Gly] составил 89%.

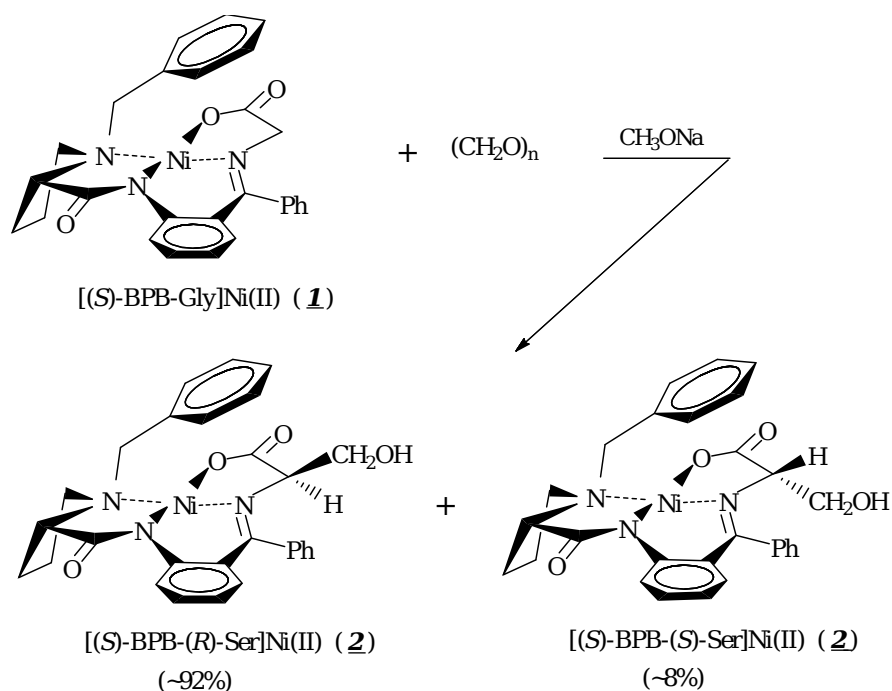
### 3.1.2. Синтез Ni(II) комплексов оснований Шиффа дегидроаланина с (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофенонами

Комплекс оснований Шиффа дегидроаминокислот можно получить дегидратацией комплексов β-окси-α-аминокислот. Однако, учитывая то обстоятельство, что OH-группа β-окси-α-аминокислот является трудно уходящей группой и ее отщепление сопровождается ретроальдольным распадом (разрыв связи C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>), в реакциях дегидратации β-окси-α-аминокислот обычно гидроксильную группу замещают легко уходящей группой. Так, через промежуточное O-ацетилирование остатков серина и треонина в хиральных комплексах иона Ni<sup>II</sup> и α,β-элиминирование уксусной кислоты из полученных комплексов O-ацетилсерина и O-ацетилтреонина были синтезированы хиральные комплексы дегидроаланина и дегидроаминомасляной кислоты. При этом на примере комплексов иона Ni<sup>II</sup> с основанием Шиффа (S)- и (R)-O-ацетилсеринов и (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофенона было показано, что элиминирование с количественными химическими выходами происходит в случае (R)-абсолютной конфигурации аминокислотного остатка.

Хиральный комплекс Ni<sup>II</sup> с основанием Шиффа (R)-серина и (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофенона ранее был получен как прямой реакцией комплексообразования (R,S)-серина (по аналогии синтеза комплекса Ni<sup>II</sup> [(S)-BPB-Gly], так и конденсацией формальдегида к остатку глицина комплекса Ni<sup>II</sup>[(S)-BPB-Gly] в присутствии сильного основания (CH<sub>3</sub>ONa или KOH в CH<sub>3</sub>OH), так как это было показано ранее, в присутствии сильного основания индуцируется асимметрическое образование комплексов (R)-β-окси-α-аминокислот (см. схему 5).

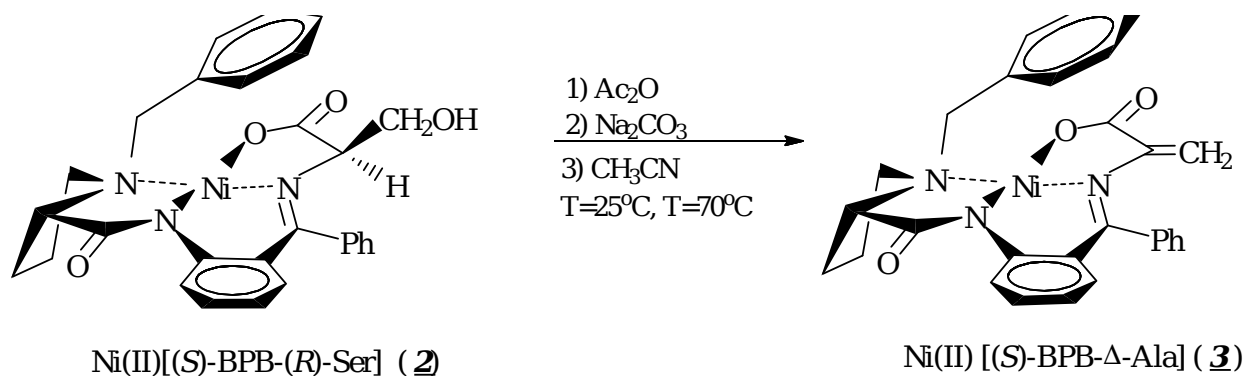
Реакция проводилась при соотношении Ni<sup>II</sup>[(S)-BPB-Gly] / CH<sub>2</sub>O / 1,5N CH<sub>3</sub>ONa ≈ 5/1/4,5. Полученный комплекс кристаллизовали из метанола. Выход комплекса Ni<sup>II</sup> [(S)-BPB-(R)-Ser] составил 93,3%.

**Схема 5**



Дегидратация полученного диастереоизомерно чистого комплекса (*R*)-серина (**2**) через промежуточное *O*-ацелирование остатка серина и  $\alpha,\beta$ -элиминирование уксусной кислотой из фрагмента (*R*)-*O*-ацетилсерина количественно происходит в среде  $\text{CH}_3\text{CN}$  под действием уксусного ангидрида и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . При этом *O*-ацелирование осуществляют при комнатной температуре, а деацелирование - при  $70^\circ\text{C}$  (см. схему 6).

**Схема 6**



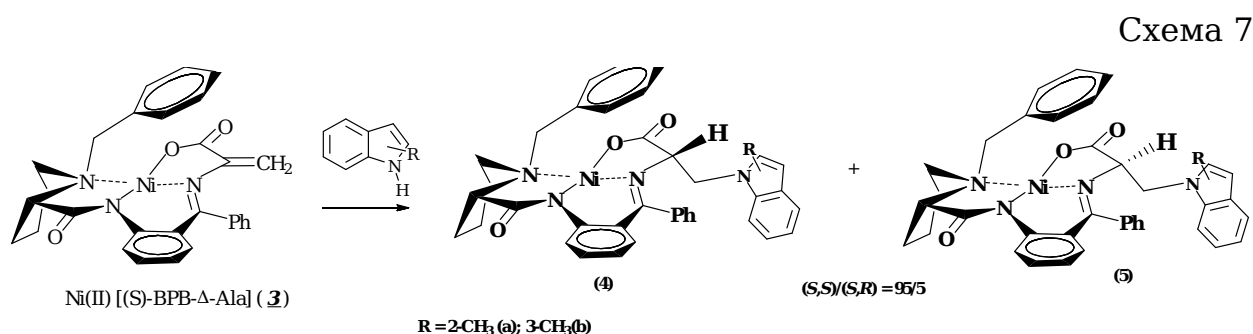
В процессе дегидратации серина каких-либо побочных продуктов не образуется. После удаления  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  реакционную смесь растворяют в  $\text{CHCl}_3$ , промывают водой до нейтральной pH, концентрируют и сушат под вакуумом.

Выход комплекса Ni<sup>II</sup> [(S)-BPB-Δ-Ala] на стадии дегидратации превышает 98,5%.

### 3.2. Асимметрические реакции присоединения по Михаэлю гетероциклических производных индола к активной С=C связи дегидроаланина в хиральном комплексе Ni<sup>II</sup> [(S)-BPB-Δ-Ala].

В качестве индольных производных были использованы 2-метил- и 3-метил-1H-индол. Реакцию проводили в атмосфере аргона для исключения процесса окисления.

За ходом реакции нуклеофильного присоединения следили методом ТСХ на SiO<sub>2</sub> в системе растворителей CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (3:1).



В начале присоединения образуется смесь двух диастереоизомер комплексов примерно в соотношении *de*70:30 (S.S)/ (S.R) в пользу более подвижного на силикагеле диастереоизомера (по данным <sup>1</sup>H-ЯМР и ТСХ). Затем постепенно по ходу реакции присоединения вследствие установления термодинамического равновесия между диастереоизомерами увеличивается количество этого диастереоизомера (таблица 3).

Таблица 3. Оптимальные параметры для нуклеофильного замещения 2-метил индолом.

№	Основание	Комплекс/ Основание / 2- метил индол (моль экв.)	Т, °С	Время (час)	Выход (%) По образованному продукту
1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1:2:1.5	55-60	24	0
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1:5:3	55-60	48	0
3	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1:10:3	55-60	48	0

4	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1:20:3	55-60	48	0
5	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1:2:1.5	55-60	24	0
6	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1:5:3	55-60	24	0
7	Et <sub>3</sub> N	1:1:3	55-60	24	0
8	NaOH	1:0.4:3	55-60	4	50
9	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1:0.1:3	55-60	4	35
10	KOH	1:0.5:2	55-60	4	40
11	KOH	1:1.5:2	20-25	48	55

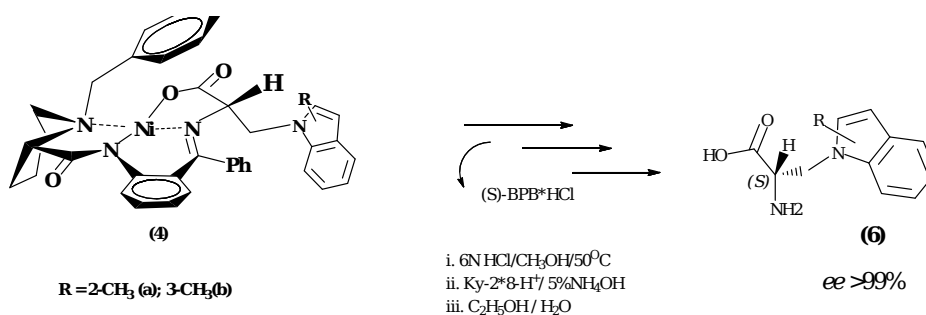
Для подборки оптимальных условий данной реакции были тестированы различные растворители (ДМФ, ТГФ, ДМСО, CH<sub>3</sub>CN), разное соотношение реагентов, а также основания. Исходя из таблицы, оптимальными условиями для проведения реакции присоединения 2-метил-1Н-индол к С=С связи дегидроаланина в хиральном комплексе Ni<sup>II</sup> [(S)-BPB-Δ-Ala] является: CH<sub>3</sub>CN, KOH в соотношении комплекс/Основание / 2-метил индол 1:5:2.

В случае использования 3-метил-1Н-индола, пришлось также разработать отдельно оптимальные условия. И это температура 55-60 °С, растворитель CH<sub>3</sub>CN, и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в соотношении комплекс/Основание / 2-метил индол 1:3:15.

#### Разложение диастереоизомерных комплексов продуктов присоединения индолов и выделение целевых аминокислот

С целью выделения целевых аминокислот, основные диастереомерные комплексы были разложены обработкой 6N HCl при температуре 45-50 °С (см. схему 8).

После исчезновения характерного для этих комплексов красного цвета, что свидетельствует о полном разложении комплексов, из реакционной смеси выделяют исходный хиральный реагент (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофенон ((S)-BPB) осаждением из водных растворов (после удаления органического растворителя вакуумным выпариванием). При этом (S)-BPB регенерируется с количественным химическим выходом (94-97%) и полным сохранением исходной оптической чистоты. Целевые аминокислоты очищают от минеральных солей ионообменным методом и кристаллизацией из водно-спиртовых растворов.



### 3.3 Биологический скрининг 2-амино-3-(2-метил-1H-индол-1-ил)-пропановой кислоты и 2-амино-3-(3-метил-1H-индол-1-ил)-пропановой кислоты

Таблица 4. - Биологический скрининг синтезированных небелковых аминокислот

Stenotrophomonas maltophilia 9286	Антибиотики	2-амино-3-(3-метил-1H-инд-1-ол) пропановая кислота концентрации 20ммоль/л	2-амино-3-(2-метил-1H-инд-1-ол) пропановая кислота концентрации 20ммоль/л
	Контроль	+	+/-
	Азитромицин	+	+/-
	Аугментин	+	+/-
	Хлорамфеникол	+	+/-
	Амоксицилин	+	+/-
	Азитромицин	+	+/-
	Ципрофлоксацин	+	+/-
	Роцефинил	+	+/-
	Стрептомицин	чувствительный	чувствительный
Цефиксим	чувствительный	чувствительный	
Канамицин	чувствительный	чувствительный	
P. aeruginosa 5249	Контроль	+	+/-
P. aeruginosa 9056	Контроль	-	-
P. Fluorescens 9150.	Контроль	-	-

В ходе проведенного эксперимента было выявлено, что небелковая аминокислота 6b подавляет рост *Stenotrophomonas maltophilia* 9286, в то время как антибиотики (азитромицин, аугментин, хлорамфеникол, амоксицилин, азитромицин, ципрофлоксацин, роцефинил) не проявляют ингибирующей активности по отношению к данному организму. В свою очередь небелковая аминокислота 6b не проявляет ингибирующей активности по отношению к следующим микроорганизмам: *P. Aeruginosa* 5249, *P. Aeruginosa* 9056, *P. Fluorescens* 9150.

Небелковая аминокислота 6a на исследуемых объектах проявляет слабую биологическую активность.



## 4. Экспериментальная часть

### 4.1. Приборы, материалы и реагенты

Во время проведения данной работы использовали следующие материалы: аминокислоты («Reanal», Будапешт), силикагель (Merck 60 (0.063-0.200 мм, 70-230) ионообменную смолу Ку-2х8, пластинки («Chemapol», Прага),  $\text{CH}_3\text{CN}$ , диметилформаид (ДМФА),  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{CHO}$ ,  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{C}_7\text{H}_{16}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,.

Нуклеофильные реагенты -2- и 3-метил индол (Sigma-Aldrich)

ДМФА перед использованием очищали согласно [55] и [56] соответственно.

Метанол очищали и абсолютировали по методике [57].

Раствор  $\text{CH}_3\text{COONa}$  готовили добавлением металлического натрия в  $\text{CH}_3\text{OH}$  под аргоном при охлаждении.

$^1\text{H}$ -ЯМР спектры снимали на приборе «Mercury-300 Varian NMR (300 MHz)».

Температуры плавления были измерены на приборе фирмы «Elektrothermal».

Энантиомерная чистота синтезированных аминокислот была определена в методом хиральной жидкостной хроматографии высокого разрешения.

### 4.2 Синтез исходных соединений

Хиральный комплекс иона  $\text{Ni}^{\text{II}}$  с основанием Шиффа глицина и хирального карбонильного соединения (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофенона  $\text{Ni}^{\text{II}}$  [(S)-BPB-Gly] (**1**) синтезировали согласно ранее разработанной методике [58]. Для этого 192 г (0,5 моля) (S)-BPB растворяли в 1750 мл  $\text{CH}_3\text{OH}$ , добавляли 290,7 г (1 моль)  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и 187,5 г (2,5 моля) глицина и при перемешивании при

температуре 40-50°C добавляли раствор 224 г (4 моля) КОН в 750 мл  $\text{CH}_3\text{O}$ . Реакционную смесь перемешивали в течение 2-3 ч при температуре 40-50°C. За ходом реакции комплексообразования следили методом ТСХ на пластинке «Silufol» в системе растворителей  $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (3:1). После завершения реакции реакционную смесь нейтрализовали уксусной кислотой до pH=5-7 и при перемешивании смесь медленно добавляли в 5-7 л воды. Смесь оставляли на 5-6 ч, воду декантировали и фильтровали продукт. После сушки кристаллов получали 221,48 г (0,445 моля)  $\text{Ni}^{\text{II}}$  [(S)-BPB-Gly] (**1**), что соответствует 89% выходу на стадии в расчете на исходное количество (S)-BPB.

Физико-химические параметры синтезированного комплекса **1** ( $R_f$  на пластинках ТСХ,  $^1\text{H}$ -ЯМР, элементный анализ, поляриметрические измерения) однозначно соответствуют литературным данным и подтверждают ожидаемую структуру комплекса глицина.

Хиральный комплекс иона  $\text{Ni}^{\text{II}}$  с основанием Шиффа (R)-серина и (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофенона  $\text{Ni}^{\text{II}}$  [(S)-BPB-(R)-Ser] (**2**) синтезировали согласно методике. Для этого 150 г (0,3 моля) комплекса  $\text{Ni}^{\text{II}}$  [(S)-BPB-Gly] (**1**) растворяли в 320 мл метанола и при комнатной температуре при постоянном перемешивании в токе аргона добавляли 31 г параформа и 147 мл 4,7N  $\text{CH}_3\text{ONa}$ . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. За ходом реакции следили методом ТСХ в системе растворителей  $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (3:1). После завершения реакции реакционную смесь нейтрализовали уксусной кислотой до нейтральной pH и оставляли на 1 ч (при комнатной температуре). Выпавшие кристаллы диастереоизомерно чистого комплекса (R)-серина фильтровали стеклянным фильтром, промывали 30 мл дистиллированной воды и сушили в сушилке под вакуумом при 50°C. Было получено 148 г (0,28 моля) хроматографически чистого комплекса  $\text{Ni}^{\text{II}}$  [(S)-BPB-(R)-Ser] (**2**), что соответствует 93,3% выходу на стадии в расчете на исходное количество  $\text{Ni}^{\text{II}}$  [(S)-BPB-Gly] (**1**).

Структуру и абсолютную конфигурацию синтезированного комплекса **2** исследовали спектральными методами:  $^1\text{H}$ -ЯМР, элементным анализом, поляриметрическими измерениями. Данные

однозначно соответствуют литературным и подтверждают ожидаемую структуру комплекса глицина.

Хиральный комплекс иона  $\text{Ni}^{\text{II}}$  с основанием Шиффа дегидроаланина и (S)-2-N-(N'-бензилпролил)аминобензофеноном  $\text{Ni}^{\text{II}}[(\text{S})\text{-BPB-}\Delta\text{-Ala}]$  (**3**) синтезировали согласно методике [59, 60]. Для этого 147 г (0,28 моля) комплекса  $\text{Ni}^{\text{II}}[(\text{S})\text{-BPB-(R)-Ser}]$  (**2**) растворяли в 930 мл ацетонитрила и при перемешивании при комнатной температур обавляли 64 г (0,613 моля) безводной  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и 224 мл (2,46 моля) перегнанного  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ . Реакционную смесь ~ 2 ч перемешивали при комнатной температуре, а затем температуру подняли до  $70^\circ\text{C}$  и продолжали перемешивать еще 1 ч. За ходом реакции следили методом ТСХ в системе растворителей  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{COCH}_3$  (2:1). После завершения реакции реакцию смесь фильтровали, осадок соды промывали 50 мл  $\text{CHCl}_3$ . Хлороформный раствор промывают вначале 100 мл дистиллированной воды, а затем 150 мл 0,1 М раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 раза по 50 мл). Затем раствор упаривают досуха под вакуумом и сушат в вакуумной сушилке при температуре  $50^\circ\text{C}$ . Было получено 140,7 г (0,276 моля) комплекса  $\text{Ni}^{\text{II}}[(\text{S})\text{-BPB-}\Delta\text{-Ala}]$  (**3**), что соответствует 98,5% выходу на стадии в расчете на исходное количество  $\text{Ni}^{\text{II}}[(\text{S})\text{-BPB-(R)-Ser}]$  (**2**).

Данные  $^1\text{H}$ -ЯМР, элементного анализа, поляриметрических измерений синтезированного комплекса **3** однозначно совпадают с данными представленными в [61].

### **4.3. Асимметрический синтез $\beta$ -замещенных аналогов аланина**

#### **4.3.1. Асимметрическое нуклеофильное присоединение 3-метилиндла к двойной $\text{C}=\text{C}$ связи комплекса $[(\text{S})\text{-BPB-}\Delta\text{-Ala}]\text{Ni}(\text{II})$**

5 г (0,0098 моль) комплекса **3** растворяли в 25 мл  $\text{CH}_3\text{CN}$  и в токе аргона добавляли 27,2 г (0,197 моль)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  и 0,03 моль 3-метилиндла - 3,85 г. Реакционную смесь перемешивали при

температуре 50-60°C в течение 3 ч. За ходом реакции присоединения следили методом ТСХ на пластинках SiO<sub>2</sub> в системе растворителей CHCl<sub>3</sub>- CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (3:1) [62]. После установления термодинамического равновесия между диастереоизомерами **4b**, (~ через 3 ч) реакцию смесь фильтровали, осадок K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> промывали хлороформом и хлороформный фильтрат упаривали досуха. Небольшую часть реакционной смеси (~1 г) растворяли в минимальном количестве смеси CHCl<sub>3</sub>- CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (3:1) и хроматографировали на колонке с SiO<sub>2</sub> (3x20 см), используя в качестве элюента CHCl<sub>3</sub>- CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (3:1). Основные диастереоизомеры с большим значением R<sub>f</sub> на SiO<sub>2</sub> (**4b**) охарактеризовали спектральными методами анализа. Химический выход составил 70,8% и соотношение диастереоизомерных комплексов 95/5. Основная часть реакционных смесей была использована для получения целевых аминокислот **5b**.

#### **4.3.2. Асимметрическое нуклеофильное присоединение 2-метилиндла к двойной C=C связи комплекса [(S)-BPB-Δ-Ala]Ni(II)**

2 г (0,00377 моль) комплекса **3** растворяли в 15 мл CH<sub>3</sub>CN и в токе аргона добавляли 0.1 г (0,0018 моль) КОН и 0,0008 моль 3-метилиндла - 1.03 г. Реакционную смесь перемешивали при температуре 20°C в течение 3 ч. За ходом реакции присоединения следили методом ТСХ на пластинках SiO<sub>2</sub> в системе растворителей CHCl<sub>3</sub>- CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (3:1) [63]. После установления термодинамического равновесия между диастереоизомерами **4a**, (~ через 24 ч) реакцию смесь фильтровали, осадок КОН промывали хлороформом и хлороформный фильтрат упаривали досуха. Небольшую часть реакционной смеси (~1 г) растворяли в минимальном количестве смеси CHCl<sub>3</sub>- CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (3:1) и хроматографировали на колонке с SiO<sub>2</sub> (3x20 см), используя в качестве элюента CHCl<sub>3</sub>- CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (3:1). Основные диастереоизомеры с большим значением R<sub>f</sub> на SiO<sub>2</sub> (**4a**)

охарактеризовали спектральными методами анализа. Химический выход составил 60,5% и соотношение диастереоизомерных комплексов 95/5. Основная часть реакционных смесей была использована для получения целевых аминокислот **6a**.

***Спектральные данные синтезированных комплексов 4a и 4b (Приложение 1,2):***

**Комплекс 4a: Выход 60,5%,  $T_{\text{плав}}$  190-195°C,  $[\alpha]_D^{20} = +1950,0^{\circ}$  (C=0.15, CH<sub>3</sub>OH).** Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д., 300 мГц): 1.95-2.09 (2H, γ, δ-H<sub>α</sub>, Pro); 2.36 (3H, br, CH<sub>3</sub>); 2.43-2.52 (2H, m, β-CH<sub>2</sub> Pro); 3.10-3.31 (2H, m, γ, δ-H<sub>β</sub>, Pro); 3.41 (1H, dd, J=9.6,7.4,α-H-Pro); 3.49 (1H, d, J=12.6,CH<sub>2</sub>Ph); 4.35 (1H, d, J=12.6,CH<sub>2</sub>Ph); 4.43 (1H, dd, J=7.8,3.5,CH<sub>2</sub>CH); 4.50 (1H, dd, J=14.9,3.5, CH<sub>2</sub>CH); 5.09 (1H, dd, J=14.9,7.8, CH<sub>2</sub>CH); 5.94 (1H, br, d, J=7.6); 6.22 (1H, br, CH=CH<sub>3</sub>); 6.51 (1H, dd, J=8.2,1.7, Ar); 6.61 (1H, ddd, J=8.2,6.9, 1.2, Ar); 6.86 (1H, ddd, J=8.1,7.2, 1.2, Ar); 6.98 (1H, ddd, J=7.7,7.2, 1.0, Ar); 7.04-7.18 (4H, m, Ar); 7.73-7.34 (2H, m, Ar); 7.37-7.45 (2H, m, Ar); 8.01-8.06 (2H, m, Ar); 8.31 (1H, dd, J=8.7, 1.1, Ar). <sup>13</sup>C Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д., 75.46 мГц): 12.9 (CH<sub>3</sub>); 24.0 (γ-CH<sub>2</sub> Pro); 30.8 (β-CH<sub>2</sub> Pro); 48.9 (CH<sub>2</sub>); 57.3 (δ-CH<sub>2</sub> Pro); 63.4 (CH<sub>2</sub> Ph); 70.7 (α-CH Pro); 71.2 (CH); 101.8; 109.4; 119.6; 120.2; 120.7; 121.3; 123.5; 125.8; 127.0; 127.6; 128.5; 128.9; 129.0; 129.0 (2CH); 129.4; 131.5 (2CH); 132.9; 133.1; 133.4; 134.0; 136.9; 137.9; 143.0; 172.3; 176.6; 180.1.

**Комплекс 4b: Выход 70,8%,  $T_{\text{плав}}$  235-240°C,  $[\alpha]_D^{20} = +1756,7^{\circ}$  (C=0.15, CH<sub>3</sub>OH).** Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д., 300 мГц): 1.36-1.48 (1H, m, H-Pro); 1.70-1.98 (3H, m, H-Pro); 2.04-2.17 (1H, m, H-Pro); 2.35- (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2.77-2.85 (1H, m, H-Pro); 3.17 (1H, dd, J=9.8,7.5,α-H-Pro); 3.40 (1H, d, J=12.5,CH<sub>2</sub>Ph); 4.13 (1H, dd, J=15.0,3.0,NCH<sub>2</sub>CH); 4.18 (1H, d, J=12.5, CH<sub>2</sub>Ph); 4.32 (1H, dd, J=3.8,3.0, CH); 4.57 (1H, dd, J=15.0,3.8,NCH<sub>2</sub>CH); 6.65-6.71 (2H, m, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 6.84 (1H, br, =CH); 6.90 (1H, br,d J=8.0, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 7.04-7.21 (5H, m,Ar); 7.27-7.33 (2H, m, Ar); 7.38 (1H, td, J=7.5,1.3, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 7.48-7.62 (3H, m, Ar); 7.94-7.99 (2H, m, H-2.2-Ph); 8.32(1H, d, J=8.7, H-6 C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). <sup>13</sup>C Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д., 75.46

мГц): 9.8 (CH<sub>3</sub>); 22.8 (γ-CH<sub>2</sub> Pro); 30. (β-CH<sub>2</sub> Pro); 50.0 (CH<sub>2</sub>); 57.3 (δ-CH<sub>2</sub> Pro); 63.5 (CH<sub>2</sub> Ph); 70.6 (α-CH Pro); 71.7 (NCH); 110.1 (CH); 112.0 ; 119.0 (CH); 119.7 (CH); 120.6 (CH); 122.5 (CH); 123.7 (CH); 125.8; 127.3 (2CH); 127.7 (CH); 128.8 (2CH); 128.9 (CH); 129.2 (CH); 129.4 (CH); 129.5 (CH); 130.0; 131.6 (2CH); 132.9 (CH); 133.3; 133.7 (CH); 134.1; 137.9; 143.6; 171.1; 177.4; 180.2.

#### **4.4. Разложение полученных комплексов и выделение целевых аминокислот**

Разложение диастереоизомерных смесей продуктов присоединения к комплексу [(S)-BPB-Δ-Ala]Ni(II) и выделение целевых оптически активных гетероциклически замещенных α-аланина проводили действием 6N HCl по ранее разработанной методике [64, 65]. Смесь диастереоизомерных комплексов в количестве 2 г (0,003 моль) растворяли в 80 мл CH<sub>3</sub>OH и при перемешивании добавляли 20 мл раствора 6N HCl. После исчезновения характерной для комплекса окраски реакционную смесь упаривали досуха, добавляли 50 мл H<sub>2</sub>O и фильтровали исходный хиральный реагент (S)-BPB. Из водного фильтрата выделяли целевую аминокислоту ионообменным методом, с использованием катионообменной смолы Ky-2x8 в H<sup>+</sup> форме. Аминокислоту элюировали со смолы 5% раствором NH<sub>4</sub>OH, концентрировали под вакуумом и кристаллизовали из раствора этанол-вода (1:1).

Энантиомерный анализ аминокислоты 6a и 6b проводили методом хирального ВЭЖХ анализа на приборе «Waters separations module 2695», на колонке «Diaspher-110-Chirasel-E» (6,0 мкм, 4,0×250 мм) с подвижной фазой метанол/0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O в соотношении 20/80. Скорость потока подвижной фазы 0,5 мл/мин. В качестве детектора использовали УФ-детектор при длине волны 200 нм. Аминокислоту анализировали в виде водного раствора при температуре колонок 30°C

(Приложение 1-2). Элементный анализ проводили на элементном CNS-О анализаторе «Euro EA 3000».

***Спектральные данные синтезированных комплексов 6a и 6b (Приложение 3,4):***

**Комплекс 6a:** Выход 10.5%,  $T_{\text{плав}}$  250°C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2.9^{\circ}$  (C=0.005, 6N HCl). Найдено, %:  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$  (218,25) C 69.27; H 6.41; N 12.82. Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMS- $\text{D}_6$ +TFA,  $\delta$ , м.д., 300 МГц): 2.41 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 4.18 (1H, t,  $J=6.6$ , CH); 4.57 (2H, d,  $\text{CH}_2$ ,  $J=6.7$ ); 6.91-7.01 (2m, 1H); 7.01-7.11 (1H, m); 7.39 (2H, d,  $J=8.5$ );  $^{13}\text{C}$  Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMS- $\text{D}_6$ +TFA,  $\delta$ , м.д., 400 МГц): 9.31 ( $\text{CH}_3$ ); 45.12 ( $\text{CH}_2$ ); 52.52 (CH); 109.21 (CH); 110.4; 118.3; 118.7 (CH); 121.4 (CH); 126.2 (CH); 128.8; 136.6; 168.9.

**Комплекс 6b:** Выход 25.3%,  $T_{\text{плав}}$  256°C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +5.0^{\circ}$  (C=0.20, 6N HCl). Найдено, %:  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$  (218,25) C 69.27; H 6.41; N 12.82; Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMS- $\text{D}_6$ +TFA,  $\delta$ , м.д., 300 МГц): 2.28 (s,  $\text{CH}_3$ ); 4.28 (d,  $\text{CH}_3$ ,  $J=5.7$ ); 4.59 (d,  $\text{CH}_2$ ,  $J=5.7$ ); 7.01 (br, dd,  $J=8.1, 7.1$ ); 7.04 (s, =CHN); 7.12 (dd,  $J=8.1, 7.1$ ); 7.43 (br, d,  $J=8.1$ ); 8.69 (br,  $\text{NH}_2$ ); 12.6 (br, COOH).  $^{13}\text{C}$  Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMS- $\text{D}_6$ +TFA,  $\delta$ , м.д., 400 МГц): 9.3 ( $\text{CH}_3$ ); 45.1 ( $\text{CH}_2$ ); 52.5 (CH); 109.2 (CH); 110.4; 118.3; 118.7 (CH); 121.4 (CH); 126.2 (CH); 128.7; 136.5; 168.8.

***4.5. Диффузионный (двух слойный) метод определения антибактериальной активности.***

Материалы: Питательный агар (состав: Пептический перевар живой ткани 5.00г/л, Натрия хлорид 5.00г/л, Мясной экстракт 1.50г/л, Дрожжевой экстракт 1.5 г/л, Агар-агар 15.0 г/л). Культура - *Stenotrophomonas maltophilia* 9286.

В стерильные чашки Петри чашки разливают фиксированный объём 2% питательной среды с антибиотиком: Азитромицин - 50 мкг/мл, Аугментин - 50 мкг/мл, Хлорамфеникол - 10 мкг/мл, Амоксицилин - 50 мкг/мл, Азитромицин - 50 мкг/мл, Ципрофлоксацин - 50 мкг/мл, Роцефинил - 50 мкг/мл, Стрептомицин - 100 мкг/мл, Цефиксим - 50 мкг/мл, Канамицин - 50 мкг/мл. После того, как среда застынет, производят посев суспензии клеток ночной культуры по 0,2 мл, путем расплавления столбиков с 0,7%-м питательным агаром. Далее на верхний слой наносим по 3 мкл раствора исследуемого вещества. По

усредненному радиусу зон подавления роста судят об ингибирующем эффекте раствора с использованием статистического метода анализа.

Приготовление ночной культуры:

В 1 мл питательного бульона засеять петлей культуры и инкубировать в термостате при 30°C.

Аналогичным методом, но без добавления антибиотиков готовим еще 3 культуры для проверки биологической активности: *Pseudomonas aeruginosa* 5249, *Pseudomonas aeruginosa* 9056, *Pseudomonas fluorescens* 9150.



## Выводы

$\text{Ni}^{\text{II}}$  комплекс является хорошим синтоном для синтеза производных (S)-аланина с содержанием индольного кольца.

В ходе проведения исследования нами были подобраны оптимальные условия для нуклеофильного присоединения 3- и 2-метил-индола. Метильная группа во 2 положении индольного кольца мешает нуклеофильному присоединению, в следствии чего проведение данной реакции требует более жестких условий.

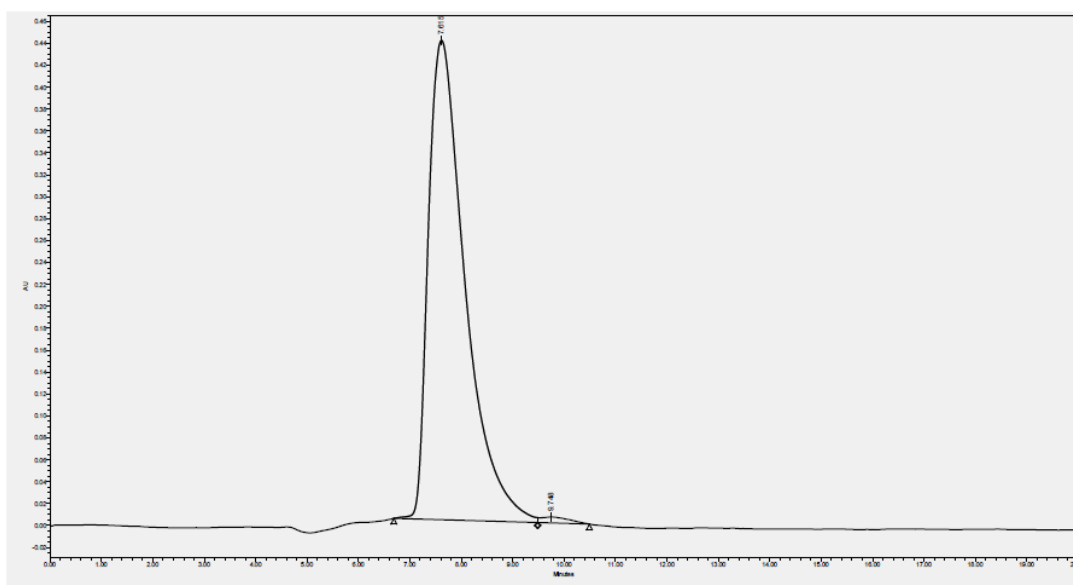
В результате биологического скрининга было доказано, что 2-амино-3-(3-метил-1H-индол-1-ил)-пропановая кислота (6b) подавляет рост *Stenotrophomonas maltophilia* 9286, в то время как антибиотики (азитромицин, аугментин, хлорамфеникол, амоксицилин, азитромицин, ципрофлоксацин, роцефинил) не проявляют ингибирующей активности по отношению к данному организму. В свою очередь небелковая аминокислота 6b не проявляет ингибирующей активности по отношению к следующим микроорганизмам: *P. Aeruginosa* 5249, *P. Aeruginosa* 9056, *P. Fluorescens* 9150.

2-амино-3-(2-метил-1H-индол-1-ил)-пропановая кислота (6a) на исследуемых объектах проявляет слабую биологическую активность. Следовательно, мы можем сделать вывод о том, что метильная группа во 2 положении негативно влияет на антибактериальную активность.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### Приложение 1

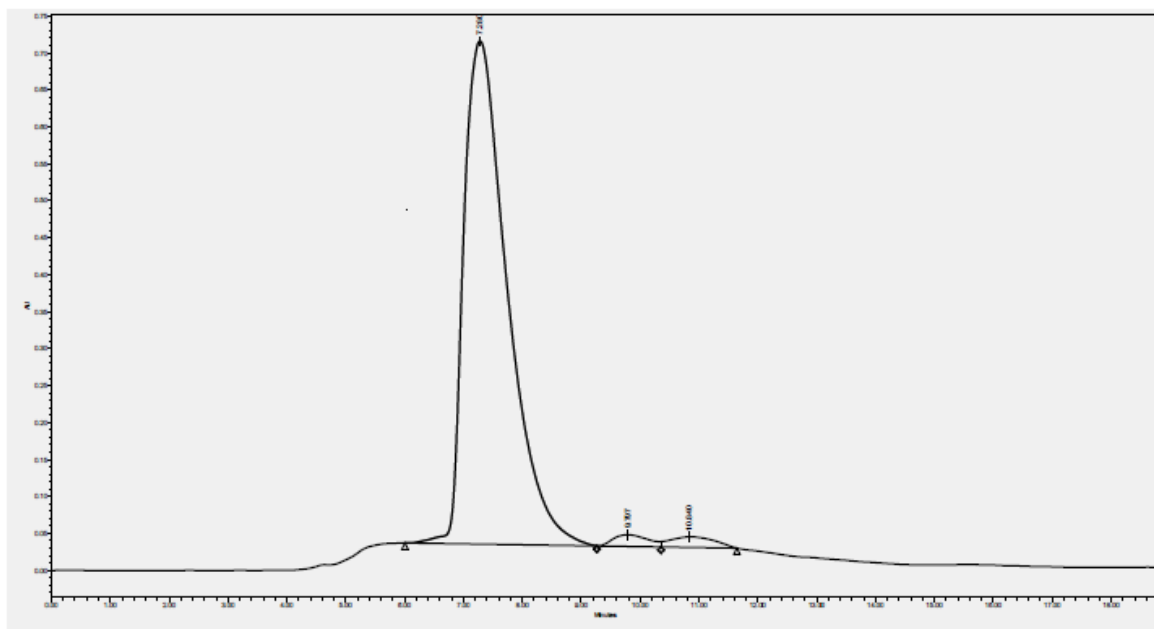
Пример хроматограммы 2-амино-3-(3-метил-1Н-инд-1-ол) пропановой кислоты (условия разделения: Diaspher-110-Chirasil-E 6,0 мкм, 4,0×250 мм; подв. ф. метанол/0.1М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2h<sub>2</sub>o 20:80; 0,5 мл/мин; 200нм)



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		7.615	21720431	99.03	437280
2		9.748	211835	0.97	5441

## Приложение 2

Пример хроматограммы 2-амино-3-(2-метил-1H-инд-1-ол) пропановой кислоты (условия разделения: Diaspher-110-Chirasil-E 6,0 мкм, 4,0×250 мм; подв. ф. метанол/0.1М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2h<sub>2</sub>o 20:80; 0,5 мл/мин; 200нм)



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		7.280	35011032	96.16	680357
2		9.797	648329	1.78	15820
3		10.840	750978	2.06	14363

## **Литература**

- <sup>1</sup> Акжигитова А.А., Ковалева А.А. Характеристика непротеиногенных аминокислот // Материалы VIII Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум», 2016. - №1. - С.10-11
- <sup>2</sup> Хохлов А.П., Доценко А.Н., Перспективы использования аминокислот в неврологии и онкологии // Метаболическая терапия эффективное лечение. - 2003. - №2. - С.20-25.
- <sup>3</sup> E. Arthur Bella , Alison A. Watsonb and Robert J. Non-protein amino acids Plant soil and ecosystem interactions // Plant Soil Interactions. - 2011. - № 342. - С. 31-48.
- <sup>4</sup> Синдирева А. В. Влияние селенсодержащих удобрений на урожайность и качество зеленой массы рапса ярового. // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. - 2017. - №2(9). - С.1-5.
- <sup>5</sup> Маршалл,В.Дж. Клиническая биохимия, :-е издание, переработанное и дополненное / В. Дж. Маршалл, С. К. Бангерт. - М. - СПб : БИНОМ - Диалект. 2011. - 408 с., ил.
- <sup>6</sup> Спенсер П.С. Потребление нестабилизированных продуктов питания (строчки обыкновенные) и риск развития нейродегенеративных заболеваний (бокового амиотрофического склероза) // Анализ риска здоровью. - 2020. - №3. - С.94-100.
- <sup>7</sup> Белоконь Ю.Н., Малеев В.И., Петросян А.А., Савельева Т.Ф., Иконников Н.С., Перегудов А.С., Хрусталеv В.Н., Сагиян А.С. - Изв. РАН, сер. хим., 2002, №8, сс.1464-1470.
- <sup>8</sup> Ермакова И. П..Физиология растений: учебник для студентов вузов. - Москва: М. : Изд. центр «Академия», 2005. - 640 с.
- <sup>9</sup> Максимов И.В. Иммуитет растений и способы его повышения. // Вестник Академии наук Республики Башкортостан. - 2010. -Том 15. - №3. - С.60-69.
- <sup>10</sup> Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н. Биологически активные нерибосомальные пептиды. II. Механизм биосинтеза нерибосомальных пептидов // Антибиотики и химиотерапия.- 2012. - № 57. - С.55-67.
- <sup>11</sup> Fiore A., Society M.P., Murray P. J.,Tryptophan and indole metabolism in immune regulation // Current Opinion in Immunology. - 2020. - №70. -

C.7-14.

- <sup>12</sup> Lundblad R. L. Chemical Modification Of Tryptophan // Chemical Reagents for Protein Modification - 2020. - №1. - С.215-238.
- <sup>13</sup> Кратенко А.С., Вовк К.В., Сокруто О.В., Николенко Е.Я., Александрова Н.К., Ларичева Л.В., Кандыба В.П., Квитчатая А.И., Летик И.В. L-триптофан: гипотензивное, гипогликемическое, кардиопротекторное действие и особенности метаболизма при экспериментальном стрессе. - 2014. - Том17. - №.1 (57). - С.239-341.
- <sup>14</sup> Sandra W., Dunlop, Rachael A., Rowe, Anthony, Double, Kay L.,Rodgers, Kenneth J., L-DOPA is incorporated into brain proteins of patients treated for Parkinson's disease, inducing toxicity in human neuroblastoma cells in vitro. // Exp. Neurol. - 2012. - № 1 (238). - С.29-37.
- <sup>15</sup> Kumar, Shiv, Bejiga, G., Ahmed, S., Nakkoul, H., Sarker, A., Genetic improvement of grass pea for low neurotoxin (b-ODAP) content. Food Chem. Toxicol. // Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. - 2011. - № 49 (3). - С.589-600.
- <sup>16</sup> Dunlop, R.A., Cox, P.A., Banack, S.A., Rodgers, K.J., The non-protein amino acid BMAA is incorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation. // PLoS One. - 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075376>.
- <sup>17</sup> Okle, Oliver, Stemmer, Kerstin, Deschl, Ulrich, Dietrich, Daniel R.. L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low nonexcitotoxic concentrations. // Toxicol. Sci. Off. J. Soc. - 2012. - №131(1). - С. 217-224.
- <sup>18</sup> Zhang F., Wang G. A review of non-nucleoside anti-hepatitis B virus agents. // Eur. J. Med. Chem. - 2014. - №75. - С.267-281.
- <sup>19</sup> Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н. Биологически активные нерибосомальные пептиды. I. Механизм биосинтеза нерибосомальных пептидов // Антибиотики и химиотерапия.- 2011. - № 56. - С.57-69.
- <sup>20</sup> Fernando Rodrigues de Sá A., Barreiro E.J., Carlos A.M. F.. From Nature to Drug Discovery: The Indole Scaffold as a 'Privileged Structure' // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. - 2009. - №9. - С.782-793.

- 21 Yong-Jin Wu. New Indole-Containing Medicinal Compounds. // *Top Heterocycl Chem.* - 2010. - №26. - С.1-29.
- 22 Ming-Zhi Z., Qiong C., Guang-Fu Y. A review on recent developments of indole-containing antiviral agents. // *European Journal of Medicinal Chemistry.* - 2015. - №89. - С.421-441
- 23 Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н. Биологически активные нерибосомальные пептиды. III. Механизм биосинтеза нерибосомальных пептидов // *Антибиотики и химиотерапия.*- 2012. - № 57. - С.43-55.
24. Rachael A. D., Brendan J. M., Kenneth J. R. The deleterious effects of non-protein amino acids from desert plants on human and animal health // *Journal of Arid Environments.* - 2014. - №1. - С.1-7.
- 24
- 25 Ruggiero R. A., Bruzzo J., Chiarella P., Bustuoabad O. D., Meiss R.P., Pasqualini C.D. Concomitant tumor resistance: the role of tyrosine isomers in the mechanisms of metastases control. // *Cancer Res.* - 2012. - №72(5). - С.1043-1050.
- 26 B. Biersack, R. Schobert, Indole compounds against breast cancer: recent developments. // *Curr. Drug Targets.* - 2012. - №13. - С.1705-1719.
- 27 Cardillo G., Tomasini C. Asymmetric synthesis of  $\alpha$ -amino acids and  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -amino acids. // *Chemical Society Reviews.* - 1996. - №25. - С. 117-128. - 10.1039/CS9962500117.
- 28 Болотин С.Н., Буков Н.Н., Панюшкин В.Т., Волынкин В.А. Координационная химия природных аминокислот. М.: ЛКИ. - 2008. - 240 с;
- 29 John M. Walker. Non-Protein Amino Acids in the Design of Secondary Structure Scaffolds // *Article in Methods in Molecular Biology.* - 2006. - С.304.
- 30 Merino P., Tejero T., Delso I., Ghirardello M. Synthesis of Amino Acid-Nucleoside Conjugates. // *Asian Journal of Organic Chemistry.* - 2016. - №5. - 10.1002/ajoc.201600497.
- 31 Saghyan A.S., Mkrtchyan A.F., Dadayan A.S., Petrosyan S.G. Asymmetric synthesis of enantiomerically enriched (S)- $\alpha$ -aminopropionic acids containing heterocyclic side chains // *Tetrahedron: Asymmetry.* -

2013. - №24. - С. 229-232.
- <sup>32</sup> Геолчанян А.В. Асимметрический синтез (s)-2-амино-3-(6-амино-1,2-диметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-пропионовой кислоты. // Химический журнал Армении. - 2012. - №4(65). - С.506-510.
- <sup>33</sup> Roviello G.N., Mottola A., Musumeci D., Bucci E.M., Pedone C. Synthesis and aggregation properties of a novel enzymatically resistant nucleoamino acid. // Amino Acids. - 2012. - №43. - С.1465-1470.
- <sup>34</sup> Дадаян А. С., Дадаян С. А., Погосян А. С., Сагиян А. С. Синтезиисследование новых хиральных Ni (II) -комплексовоснования Шиффа бета -аланина. // Химический журнал Армении. - 2014. - №1-2(67). - С.233-238.
- <sup>35</sup> Velíšek J., Kubec R., Cejpek K. Biosynthesis of Food Constituents: Amino Acids: 4. Non-protein Amino Acids - a Review // Czech J. Food Sci.-2016. - Том.24. - №3. - С.93-109.
- <sup>36</sup> Peter B., Nunna E., Arthur B., Alison A. Toxicity of Non-protein Amino Acids to Humans and Domestic Animals // Article in Natural Product Communications . - 2010. - Том5. - №3. - С.485-504.
- <sup>37</sup> Su Jie, Su Fan, MingFang, Shangyang, Hao Aiyu. Selection of Amino Acids and the Biomimetic Synthesis of Amido Bond in the Presence of  $\beta$ -CD. // Synthetic Communications. - 2014. - №44. - 10.1080/00397911.2013.850093.
- <sup>38</sup> Shinkai S., Hamada H., Dohyama A., Manabe O. ChemInform Abstract: NADH model reduction: biomimetic synthesis of  $\alpha$ -amino acids from  $\alpha$ -keto acids. // Chemischer Informationsdienst. - 1980. - 11. 10.1002/chin.198031305.
- <sup>39</sup> Devedjiev I., Bairyamov S., Videva V. Biomimetic synthesis of esters of natural amino acids. // Heteroatom Chemistry. - 2008 - № 19. - С. 252-255.
- <sup>40</sup> Li Li, Liu Jianbo, Yang Xiaohai, Huang J., Wang K. Biomimetic synthesis of highly biocompatible gold nanoparticles with amino acid-dithiocarbamate as a precursor for SERS imaging. // Nanotechnology. - 2016. - №27. - 105603. 10.1088/0957-4484/27/10/105603.
- <sup>41</sup> Dunlop R.A., Cox P.A. Misincorporation of a non-protein amino acid into human proteins // Institute for Ethnomedicine. - 2013. - №8. - С.1-8.



- <sup>42</sup> Shinkai S., Hamada H., Dohyama A., Manabe O. Biomimetic synthesis of  $\alpha$ -amino acids from  $\alpha$ -keto acids. // *Tetrahedron Letters*. -1980. - №21. - С.1661-1664. - 10.1016/S0040-4039(00)77779-3.
- <sup>43</sup> Capra Julien. Biomimetic synthesis of biologically active nitrogen-containing compounds. - 2011.
- <sup>44</sup> E. Arthur Bella , Alison A., Watsonb and Robert J. Non-Protein Amino Acids: A Review of the Biosynthesis and Taxonomic Significance // *Natural Product Communications*. - 2008. - Том.3. - №1. - С.93-100.
- <sup>45</sup> Chuang L., Zhongyi J., Zhenwei T., Yixiao L. Biomimetic synthesis of inorganic nanocomposites by a de novo designed peptide. // *RSC Advances*. - 2014. - №4. - С. 434-441. - 10.1039/c3ra44630a.
- <sup>46</sup> Roviello G.N., Musumeci D., D'Alessandro C., Pedone C. Binding ability of a thymine-functionalized oligolysine towards nucleic acids. // *Bioorg Med Chem*. - 2014. - №22. - С.97-102.
- <sup>47</sup> Ran Lu, Hongpeng Li, Chao Ge. Regioselective Biomimetic Synthesis of Dimeric Oxyresveratrol. // *Derivatives. Synlett*. - 2020. - №31. - 10.1055/s-0040-1707257.
- <sup>48</sup> Сагиян А. С., Багдасарян А. С., Манасян Л. Л. Высокоселективный асимметрический синтез (s)-о-метилсерина. // *Химический журнал Армении*. - 2008. - №1(61). - С.79-85.
- <sup>49</sup> Saghyan A.S., Simonyan H.M., Petrosyan S.G., Geolchanyan A.V., Roviello G.N. Thiophenyl-substituted triazolyl-thione L-alanine: asymmetric synthesis, aggregation and biological properties // *Amino Acids*. - 2014. - №14. - С. 1-8.
- <sup>50</sup> Saghiyan A.S., Dadayan S.A., Petrosyan S.G., Manasyan L.L. New chiral Ni<sup>II</sup> complexes of Schiff's bases of glycine and alanine for efficient asymmetric synthesis of  $\alpha$ -amino acids // *Tetrahedron: Asymmetry*. - 2006. - №17. - С. 455-467.
- <sup>51</sup> . Blanco P, Corona F, Martínez JL. Участие транспортера эффлюксной помпы RND SmeH в приобретении резистентности к цефтазидиму при стенотрофомонадной мальтофилии. *Sci Rep*. 2019 Mar 20;9(1):4917. doi: 10.1038/s41598-019-41308-9... PMID: 30894628; PMCID: PMC6426872.

- <sup>52</sup> Kaye, K. S. & Pogue, J. M. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. // *Pharmacotherapy*. – 2015. – № 35. – С.949–962.
- <sup>53</sup> Lira, F., Berg, G. & Martinez, J. L. Double-Face Meets the Bacterial World: The Opportunistic Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. // *Frontiers in microbiology*. –2017. – № 8. – С.2190.
- <sup>54</sup> Jeon, Y. D. et al. Risk factors for mortality in patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – № 95. – С. 4375.
- <sup>55</sup> Walter M., Ramaley L. – *Analyt. Chem.*, 1973, v. 45, №1, pp.165-168.
- <sup>56</sup> Гордон А., Форд Р. – Спутник химика. Издат. «Мир», М., 1976.
- <sup>57</sup> Bates H.H., Mullaly J.M., Hartley H. – *J. Chem. Soc.*, 1923, v. 123, pp. 401-406.
- <sup>58</sup> Belokon Yu. N., Tararov V. I., Maleev V. I. [Improved procedures for the synthesis of \(S\)-2-\[N-\(N'-benzylprolyl\)amino\]benzophenone \(BPB\) and Ni\(II\) complexes of Schiff's bases derived from BPB and amino acids.](#) *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998** v. 9, p. 4249-4252.
- <sup>59</sup> Геолчанян А.В. Асимметрический синтез (s)- β -[3-(о-нитрофенил)-4-фенил-5-тио-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланина. // *Химический журнал Армении*. – 2011. – №2(64). – С. 218-224.
- <sup>60</sup> Belokon Yu. N., Saghyan A. S., Djamgaryan S. M., Bakhmutov B. I., Belikov V. M. Asymmetric Synthesis of β-Substituted α-Amino Acids via a Chiral Ni(II) Complexes of Dehydroalanine. *Tetrahedron*, **1988**, vol. 44, issue 17, p. 5507-5514.
- <sup>61</sup> Сагиян А.С. Энантиомерно чистые небелковые аминокислоты. Способы получения. М., Наука, 2010.
- <sup>62</sup> Шекеева К.К. Технология отделения аминокислот бумажной хроматографией. // *Вестник Казахского Национального медицинского университета*. – 2018. – №1. – С.331-334.
- <sup>63</sup> Шекеева К.К. Технология отделения аминокислот бумажной хроматографией. // *Вестник Казахского Национального медицинского университета*. – 2018. – №1. – С.331-334.
- <sup>64</sup> Мкртчян Г. М. Асимметрический синтез энантиомерно обогащенной (s)-2-амино-3-(2-тиоксотиазолидин-3-ил)пропионовой кислоты. // *Химический журнал Армении*. – 2013. – №1(66). – С.84-89.

- <sup>65</sup> Геолчанян А.В. Асимметрический синтез (s)- β-(3-бутил-4-пропил-5-тио-1,2,4-триазол-1-ил)-α-аланина. // Химический журнал Армении. - 2011. - №1 (64). - С. 47-53.