



УДК 547.466'11*2:542.95

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ
ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ АМИНОКИСЛОТ

© 1995 г. А. Б. Пшеничникова*, Е. Н. Карнаухова, Е. Н. Звонкова, В. И. Швец

*Московская академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,
117571, Москва, пр. Вернадского, 86*

Поступила в редакцию 11.06.93 г. После доработки 21.10.94 г.

Рассмотрены современное состояние и перспективы использования аминокислот, меченных стабильными изотопами. Систематизированы способы получения дейтериймеченных аминокислот – синтетические, химико-ферментативные, биосинтетические, а также реакции изотопного замещения водорода. Обсуждаются проблемы получения оптически чистых аминокислот.

Ключевые слова: аминокислоты дейтериймеченные, изотопный обмен водорода, химический синтез, ферментативное получение, биосинтез.

*Методы получения и перспективы
использования аминокислот,
меченных стабильными изотопами*

Последние годы аминокислоты, меченные стабильными изотопами – ^2H , ^{13}C , ^{15}N и ^{18}O , – привлекают всевозрастающее внимание исследователей. Тенденции к предпочтительному применению стабильных изотопов по сравнению с радиоактивными обусловлены главным образом такими их преимуществами, как отсутствие радиационной опасности и возможность определения локализации метки в молекуле прямыми методами.

Поскольку изоморфное изотопное замещение одного или нескольких атомов в молекуле практически не сказывается на ее стерических свойствах и электронном состоянии, наиболее подходящим и перспективным современным подходом к изучению структуры и функций биологически активных веществ, а также биологических систем на молекулярном уровне представляется исследование меченых структур с помощью изотопно-чувствительной техники, не изменяющей нативное состояние молекул.

Использование аминокислот и других биологически активных соединений, меченных стабильными изотопами, в значительной мере ограничивается малой доступностью и дороговизной самих высокоочищенных изотопов, выделяемых из природных источников. Природная распространенность стабильных изотопов варьирует от 0.015% (относительно общего количества элемента) для дейтерия до 1.11% для ^{13}C . Однако, несмотря на низкое содержание изотопов, разработанные в последние годы методы очистки позво-

ляют получать низкомолекулярные меченые вещества высокой изотопной чистоты.

Развитие изотопно-чувствительной техники, прежде всего ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и масс-спектрометрии, способствовало более интенсивному использованию стабильно меченных веществ в биологических исследованиях разнообразного характера [1 - 3].

Весьма перспективным методом детекции соединений, меченных стабильными изотопами, является ИК-спектроскопия Фурье, которая была успешно применена для определения содержания ^{13}C в клинических анализах образцов газобразных продуктов метаболизма [2, 4]. Интенсивное развитие техники и методологии ЯМР за последние годы сделало возможным исследование метаболизма веществ *in vivo*, а также способствовало изучению структур и механизмов действия биологически активных соединений. Особую ценность в этом аспекте представляют исследования пространственной структуры белка. В отличие от рентгеноструктурного анализа, для которого требуются ощутимые количества веществ в виде кристаллов [5, 6], что возможно не для всех белков, ЯМР в его различных вариантах может дать структурную информацию о веществах в растворе [7] или других некристаллических формах (см., например, [8, 9] о ЯМР “твердого” состояния).

С помощью техники многомерной ЯМР-спектроскопии [10] успешно определяется пространственная структура сравнительно маленьких белков с молекулярной массой около 10 кДа [11, 12]. Для белков с большей молекулярной массой интерпретация спектральных данных ЯМР усложняется значительным перекрытием сигналов. В связи с этим целесообразно обогащение молекул

* Автор для переписки.

белка стабильными изотопами. Так, включение ^{13}C [13] упрощает отнесение сигналов соседних углеродных атомов. Спектры ^1H -ЯМР крупных белков значительно упрощаются для интерпретации, если атомы водорода замещены на дейтерий. Равномерное замещение атомов водорода на дейтерий (так же как и включение изотопов углерода и ^{15}N) может быть достигнуто биосинтетическим путем за счет культивирования соответствующих микроорганизмов на средах, содержащих низкомолекулярные меченые субстраты [14, 15]. Метод может быть распространен и на крупные белковые молекулы с молекулярной массой вплоть до 40 кДа [16, 17].

Использование аминокислот, меченных стабильными изотопами, подходящего варианта ЯМР и соответствующего алгоритма структурных расчетов позволяет получать уникальную информацию о структуре молекул, а также более сложных молекулярных комплексов [18 - 21].

Ключевым моментом в исследованиях биологически активных соединений, меченных стабильными изотопами, является, безусловно, разработка методов их получения. В настоящее время не существует какого-либо универсального подхода для получения аминокислот, меченных стабильными изотопами (^2H , ^{13}C , ^{15}N или ^{18}O). Хорошо разработанные способы синтеза радиоактивно меченных соединений не всегда приемлемы для этих целей. В то же время существует набор разнообразных, уже апробированных методов, которые позволяют вводить требуемую метку по одному или нескольким положениям молекулы соединения в зависимости от цели его исследования.

Обобщив обширный литературный материал по получению и использованию аминокислот, меченных разными стабильными изотопами, авторы считают целесообразным рассмотреть методы получения дейтерированных аминокислот отдельно, тем более что эта область слабо освещена в отечественных и зарубежных обзорах.

Современное состояние и перспективы структурных исследований дейтерированных белков с помощью ^1H -ЯМР рассмотрены подробно Д. ЛеМастером [22 - 24]. Описанный в литературе последних лет биосинтез дейтерированных белков позволяет достигать изотопного обогащения путем

- экспрессии соответствующего гена в составе вектора в клетках (например, в *Escherichia coli*), выращенных на $^2\text{H}_2\text{O}$ -содержащих средах; так были получены образцы тиоредоксина с 50 и 75%-ным обогащением дейтерием [23, 25];

- равномерного включения метки в состав питательной среды – метода, давно уже разработанного в экспериментах с одноклеточными водорослями и метилотрофными микроорганизмами;

- использования комплексных питательных сред с мечеными аминокислотами или их предшественниками для культивирования гетеротрофных микроорганизмов (см., например, [20]).

По сравнению с соединениями, содержащими ^{13}C и ^{15}N , использование дейтерированных веществ в клинических исследованиях, а также получение последних микробиологическим путем может быть несколько ограничено ввиду значительного изотопного эффекта дейтерия [26, 27]. Кроме того, дейтериевая метка может быть потеряна за счет обратного изотопного обмена, легко протекающего по некоторым положениям молекулы аминокислоты иногда даже в водных растворах, а также и в результате ферментативного расщепления молекулы.

Настоящий обзор методов получения дейтериймеченных аминокислот состоит из четырех основных разделов. В первом разделе рассмотрены реакции ^1H - ^2H -обмена в самих аминокислотах или их производных, приводящие к дейтерированному аналогу. Во втором систематизированы синтетические методы введения метки. В третьем и четвертом разделах рассмотрены наиболее интересные примеры химико-ферментативного и биосинтетического образования дейтерированных препаратов.

Получение дейтериймеченных α -аминокислот методом ^1H - ^2H -обмена

Изотопный обмен водорода – наиболее простой и удобный метод получения дейтериймеченных оптически чистых аминокислот, однако его эффективность определяется возможностью проведения ^1H - ^2H -обмена в мягких условиях, исключающих рацемизацию. Наиболее широко этот метод применяется для получения меченных дейтерием ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина, триптофана и гистидина. Хорошо известно, что первые три аминокислоты обменивают ароматические протоны на дейтерий по механизму электрофильного замещения в растворах минеральных дейтероксилов в достаточно мягких условиях. Этим методом могут быть получены почти количественно *L*- $^{2}\text{H}_5$ фенилаланин в 85% дейтеросерной кислоте при 50°C [28], *L*- $^{2}\text{H}_5$ тирозин в 6 н. $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ или 2 н. ^2HCl при температуре кипения раствора [28 - 30] и *L*- $^{2}\text{H}_5$ триптофан в 75 - 100% дейтеротрифторуксусной кислоте [28, 29, 31] или в 2 н. ^2HCl при 50°C [32]. В молекуле гистидина легко обменивается протон при С2 имидазольного кольца в нейтральной $^2\text{H}_2\text{O}$ [28, 33] по механизму, включающему атаку нуклеофила на положительно заряженный или нейтральный имидазольный цикл и последующее его взаимодействие с молекулой $^2\text{H}_2\text{O}$ [33, 34]. Проведение изотопного обмена в более жестких

условиях, позволяющих дополнительно ввести ^2H в положения 2', 6' молекулы тирозина (8 н. $^2\text{H}_2\text{SO}_4$, 180°C [35]) или в положение 5' молекулы гистидина ($^2\text{HCl}/^2\text{H}_2\text{O}$, $p^2\text{H}$ 5.0, 180°C [36] или кипячение в $[^2\text{H}]$ трифторуксусной кислоте [37]), сопровождается рацемизацией, а следовательно, изотопным обменом водорода при С2, т.е. образуются соответственно DL -[2,2',3',5',6'- $^2\text{H}_3$]тирозин и DL -[2,2',5'- $^2\text{H}_3$]гистидин. Обратный ^2H - ^1H -обмен в этих аминокислотах в мягких условиях позволяет получить DL -[2,2',6'- $^2\text{H}_3$]тирозин [35] и DL -[2,5'- $^2\text{H}_2$]гистидин [35, 36]. DL -[2,3',5'- $^2\text{H}_3$]Тирозин получают в разбавленном растворе $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ в дейтероводе при 150°C за 20 ч [35]. Дейтерообмену в триптофане и фенилаланине в 2.4 н. растворе $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 60 - 70°C и в 8.5 н. растворе $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 180 - 190°C сопутствует рацемизация [35]. Различная способность протонов индольного кольца триптофана к ^1H - ^2H -обмену ($\text{H2} > \text{H5} > \text{H6} > \text{H7} > \text{H4}$) [32, 38] позволяет с высокой селективностью получать L -[2'- ^2H]триптофан в $^2\text{H}_2\text{O}$ при $p^2\text{H}$ 7 и 145°C [35].

Реакция ^1H - ^2H -обмена – равновесная, т.е. присутствующие в растворителе и в исходной аминокислоте протоны распределяются в соответствии с константой равновесия этой реакции, поэтому практически все приведенные выше методы получения дейтериймеченых ароматических аминокислот предполагают многократное повторение (3 - 4 раза) реакции изотопного обмена водорода со свежими порциями дейтероокислот и дейтероводы. В случае значительных потерь при выделении целевого продукта на каждой стадии целесообразнее проводить изотопный обмен в одну стадию с большим молярным избытком дейтероокислоты. Протоны у гетероатомов (N, O) предварительно замещают на дейтерий. Это достигается растворением образца в $^2\text{H}_2\text{O}$ с последующим удалением растворителя [28 - 32].

Как известно, реакции электрофильного замещения в ароматических системах катализируются солями металлов платиновой группы, что также используют для получения дейтериймеченых аминокислот. Так, тетрахлоуплатинат(II) калия в 1 н. ^2HCl в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 100°C катализирует ^1H - ^2H -обмен не только в положениях 3', 5' фенольного кольца тирозина, но и в положениях 2', 6' (на 50% за 69 ч) [39], тогда как в отсутствие катализатора в этих условиях изотопный обмен протекает очень медленно и только в положениях 3', 5'. Более того, в присутствии K_2PtCl_4 наблюдается ^1H - ^2H -обмен в фенилаланине в разбавленном растворе ^2HCl в $^2\text{H}_2\text{O}$ [40], что в отсутствие катализатора может быть достигнуто лишь в концентрированной $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ [28]. Важно, что изотопный обмен в присутствии K_2PtCl_4 протекает с сохранением конфигурации аминокислоты.

Никель Ренея [41] в мягких условиях (NaO^2H в $^2\text{H}_2\text{O}$, $p^2\text{H}$ 8 - 9) катализирует ^1H - ^2H -обмен в фенилаланине, тирозине и триптофане, однако при этом способность протонов аминокислот к изотопному замещению отличается от наблюдаемой в растворах сильных дейтероокислот [28 - 32]. В тирозине и фенилаланине практически не обмениваются протоны в *орто*-положении бензольного кольца (по отношению к боковому алкильному заместителю) и протоны у алифатического атома С2, но легко обмениваются алифатические протоны у атома С3. В триптофане не замещаются протоны у атомов С5', С6', С7' индольного кольца и у алифатического С2-атома. Катализатор Адамса в дейтероводе используют для получения полностью дейтерированного по ароматическому кольцу фенилаланина [28].

Недавно разработан новый метод получения дейтериймеченых аминокислот реакцией высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) [42, 43]. В соответствии с этим методом твердофазная система, образованная катализатором, высокодисперсным металлом группы платины (Pt, Pd, Rh), L -аминокислотой и неорганическим носителем (BaSO_4 , CaCO_3 , Al_2O_3 , углерод), контактирует с газообразным дейтерием при 180 - 250°C . В основе процесса лежит активация изотопа водорода на платиновых металлах с последующим гидрогенолизом, приводящим к образованию изотопнозамещенных аминокислот. Интересно, что включение ^2H в молекулу валина при температуре от 20 до 120°C происходит преимущественно по атому С2, при этом общая степень замещения водорода на дейтерий не превышает 5 - 10%, повышение температуры до 140 - 160°C позволяет увеличить степень замещения до 15 - 25% при неравномерном включении изотопной метки. При температуре 180°C и выше за время реакции, не превышающее 4 ч, удается достичь равновесного распределения изотопной метки в молекуле валина независимо от реакционной способности водородных атомов. Методом ВТКИО могут быть получены равномерно меченые дейтерием L -аминокислоты – аланин, глицин, гистидин, валин, серин, треонин, пролин, изолейцин со степенью замещения протона на дейтерий 80 - 97% и оптической чистотой 85 - 99%.

В отсутствие катализаторов изотопный обмен водорода у алифатических атомов углерода аминокислот протекает в жестких условиях, причем несколько более реакционноспособным является протон у атома С2, поэтому препаративно получают только [2- ^2H]аминокислоты. Реакцию проводят в 5 н. ^2HCl в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 117°C в течение 20 - 60 ч [44] или в 7 - 8 н. $^2\text{H}_2\text{SO}_4$ при 150 - 190°C за 48 ч [35]. Метод непригоден для аминокислот, разрушающихся в этих условиях. Кроме того, в ароматических аминокислотах происходит обмен

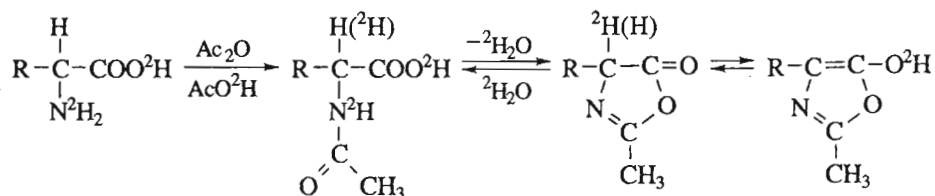


Схема 1.

ароматических протонов, что снижает селективность получения [2-²H]-аминокислот.

Карбоксильные группы соответственно в β- и γ-положениях аспарагиновой и глутаминовой аминокислот значительно облегчают ¹H-²H-обмен у соседних атомов углерода. В 6 н. ²HCl в ²H₂O при 115°C достаточно селективно могут быть получены [3-²H₂]аспарагиновая и [4-²H₂]глутаминовая кислоты [45].

Отрыв протона от атома C2 основаниями также возможен в жестких условиях, причем он значительно облегчается в случае стабилизации промежуточного карбаниона. На этом основан ряд весьма удачных методов селективного получения [2-²H]аминокислот, когда ¹H-²H-обмен осуществляли не в самой аминокислоте, а в промежуточном соединении, как образующемся в ходе реакции мечения, так и получаемом специально. К реакциям первого типа можно отнести изотопный обмен водорода в аминокислотах в присутствии пиридоксальфосфата или салицилового альдегида и раствора в ²H₂O солей Al(III) или Cu(II) соответственно [46, 47] и реакцию аминокислоты с уксусным ангидридом в дейтероуксусной кислоте [48, 49]. Эти методы приводят к рацемизации аминокислот. Ко второму типу реакций относится изотопный обмен водорода в предварительно полученных комплексах переходных металлов с аминокислотами [50] или основаниями Шиффа аминокислот [51, 52].

Кипячение аминокислоты в течение нескольких минут в смеси уксусного ангидрида с дейтероуксусной кислотой – модификация известного способа рацемизации аминокислот – эффективный метод получения DL-N-ацил[2-²H]аминокислот [48, 49]. Возможный механизм включает образование промежуточного азлактона и его кетонольную изомеризацию (схема 1). Так получают дейтерированные по алифатическому C2-атому Ile, Leu, Met, Val, Ala, Tyr, S-бензил-Cys, Pro с изотопной чистотой, превышающей 86% [48]. Полученные рацематы N-ациламинокислот могут быть далее разделены на оптически активные энантиомеры энзиматически.

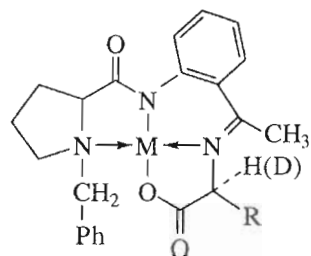
Нагревание аминокислот (Ala, Val, Leu, Ile, Glu, Gln, Met, Phe, Tyr) в дейтероводе в присутствии салицилового альдегида и ионов Cu(II) или пи-

ридоксальфосфата (пиридоксальгидрохлорида) и ионов Al(III) приводит к ¹H-²H-обмену не только у C2, но и у C3-атома, причем соотношение изотопомеров определяется условиями реакции [46, 47]. В щелочной среде при p²H 10.6 и 30°C в течение 15 - 30 ч получают DL-[2-²H]аминокислоты с изотопной чистотой более 97%; при p²H 5.5 и 100°C в течение 16 ч происходит одновременное дейтерирование при атомах C2 (с изотопной чистотой не ниже 96%) и C3 (с изотопной чистотой не ниже 94%). Если эти полностью дейтерированные при C2 и C3 аминокислоты подвергнуть ²H-¹H-обмену при pH 10.6 и 30°C в H₂O, можно получить аминокислоты, селективно дейтерированные по атому C3 (с изотопной чистотой не ниже 92%). Исключением является аспарагиновая кислота, в которой даже в щелочных условиях замещаются протоны не только у атома C2, но и у атома C3 [47]. Образование между аминокислотой и пиридоксальфосфатом основания Шиффа и его металлокомплексного соединения с Al(III) (1), в котором атом металла уменьшает электронную плотность на атомах N и O, способствует отрыву протона от атома C2 аминокислоты и образованию хиноидного комплекса (2) (схема 2). Изомеризация ароматического фрагмента этого комплекса приводит к кетимину (3) (схема 2), а его имин-енаминная изомеризация, по мнению авторов работы [47], объясняет механизм ¹H-²H-обмена у атома C3.

Другой тип реакций ¹H-²H-обмена у атома C2 аминокислот включает обменные реакции специально полученных хелатных комплексов аминокислот с Co(III) [50], комплексов оснований Шиффа аминокислот с Ni(II), Cu(II) [52] и Co(III) [51] или оксазолина, полученного из серина [53].

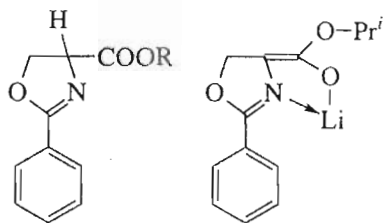
В хелатированных пятичленных глицинатных кольцах комплексов аминокислот с Co(III) [Co(en)₂(аминокислота)]X_n (где X = Cl⁻, I⁻, NO₃⁻; en – этилендиамин; аминокислота – Asp, Asn, Glu, Gln, Hse, Ala, Leu, Pro, Cys (Me)) протон у атома C2 оказывается достаточно кислым, чтобы обмениваться в щелочной среде (p²H 9.6) ²H₂O при 37°C в течение 1 - 30 сут [50]. Процесс сопровождается рацемизацией. Несмотря на простоту получения таких комплексов Co(III) и легкость последующего выделения свободных аминокислот восстановлением боргидридом натрия (без обратного

стереоселективным эффектам, которые, как оказалось, выше в комплексах Ni(II), чем в комплексах Cu(II).



(6)

M = Cu(II), Ni(II)



(7a, б)

(8)

a: R = Me; б: R = Prⁱ

Кислый характер протона при C4 молекулы 2-фенил-4-алкилоксикарбонил-оксазолина (7а или 7б), полученного конденсацией эфиров DL-серина с метилбензимидазом с общим выходом 72%, позволил авторам работы [53] осуществить изотопный обмен в этих соединениях. Оксазолин (7б) депротонируют тритиллитием в енолят (8), который обрабатывают CH₃O²H, ²H₂O, ²H₂SO₄, CH₃COO²H, либо выдерживают (7а) в растворе NaOCH₃ в ²H₂O. Разделение (S)- и (R)-[4-²H]оксазолинов (7а или 7б) проводят в виде их бромкамфорсульфонатов. Свободный L-серин получают кислотным гидролизом при кипячении в 6 н. HCl.

¹H-²H-Обмен в α-положении по отношению к атому серы в молекулах метионина и цистеина протекает в достаточно жестких условиях в присутствии NaO²H [55], однако этот обмен значительно облегчается в сульфоксиде метионина.

Последний получают окислением метионина перекисью водорода, дейтерируют в 0.85 н. NaO²H при 90°C и восстанавливают меркаптоуксусной кислотой [56]. Изотопная чистота [4-²H₂, 5-²H₃]метионина превышает 90%, оптическая чистота исходного метионина сохраняется.

Недавно описан общий метод получения различных сочетаний селективно ¹³C-, ¹⁵N- и ²H-меченных гистидинов, включающий изотопный обмен водорода и синтетические методы [36, 57]. Введение ²H достигается изотопным обменом в промежуточном соединении – DL-[5-¹⁵N]-2,5-диамино-4-оксопентановой кислоте (9). Два метиленовых атома углерода, C3 и C5, в соединении (9) были легко дейтерированы в тяжелой воде при 80°C. Повышенная кислотность атомов водорода в положениях 3 и 5 соединения (9) вызвана мощным электроноакцепторным эффектом карбонильной группы в положении 4. Имидазольное кольцо далее было образовано нагреванием DL-[3,3,5,5-²H₄, 5-¹⁵N]диаминокислоты (10), количественно полученной из производного (9), с одним из меченных стабильными изотопами роданидов натрия NaS¹⁵N или NaS¹³C¹⁵N (схема 4). Меченный 2'-меркаптогистидин (11) окисляли водным сульфатом железа(III) до DL-[3,3,5'-²H₃, 1',3'-¹⁵N₂]гистидина (12) (с изотопной чистотой 96.5 ат. %). Полностью дейтерированный DL-гистидин получили выдерживанием 2'-меченого аналога (12) при 180°C в растворе ²HCl в ²H₂O (ρ²H 5.0) [57]. Оптически активные L-изомеры соединения (12) и [2'-¹³C, 2,3,3,2',5'-²H₅, 1',5'-¹⁵N₂]гистидина выделили после ферментативного гидролиза их N-ацилпроизводных.

Весьма перспективны методы введения ²H в C2-положение аминокислот, основанные на использовании ферментов, прежде всего трансаминаз, при действии которых L-конфигурация субстрата сохраняется. Как и для других пиридоксалькатализируемых реакций, увеличение подвижности атома водорода у атома C2 объясняется образованием оснований Шиффа аминокислоты с пиридоксальфосфатом (см. выше).

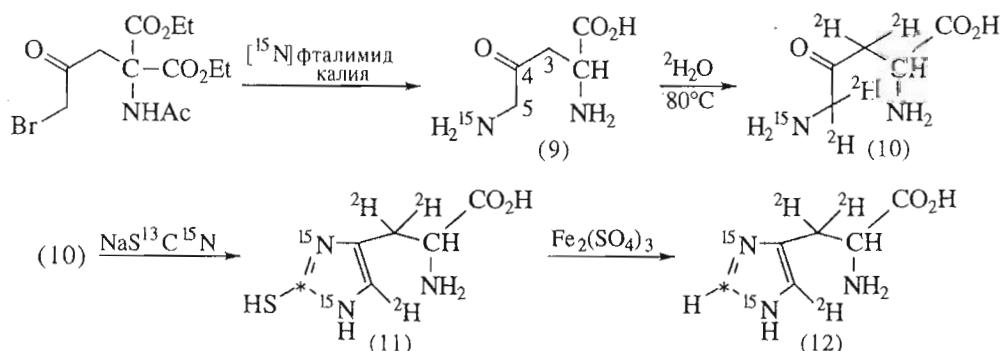


Схема 4.

Аспаратаминотрансфераза из *E. coli* (КФ 2.6.1.1) [58], субстратная специфичность которой шире, чем у трансаминаз млекопитающих, катализирует ^1H - ^2H -обмен у С2-атома в молекуле не только аспарагиновой кислоты, но и фенилаланина (хотя и почти в 10 раз медленнее) в $^2\text{H}_2\text{O}$ ($p^2\text{H}$ 7.4). Изотопный обмен водорода у атома С3 этих аминокислот в данных условиях не наблюдали. ^1H - ^2H -Обмен у атома С2 осуществляли в реакциях аминокислот, катализируемых другими пиридоксальзависимыми ферментами: триптофансинтазой из *E. coli* (КФ 4.2.1.20) [59], *L*-глутаматпируваттрансаминазой (КФ 2.6.1.2) [60], серингидрокси метилазой (КФ 2.1.2.1) (в присутствии пиридоксальфосфата и тетрагидрофолата) [60].

Из-за лабильности ферментов и сложности их получения в последнее время интенсивно разрабатываются методы, использующие интактные микробные клетки, обладающие той или иной ферментативной активностью, например препаративный метод получения оптически чистых *L*-[2- ^2H]аминокислот (Val, Leu, Ile, Met, Phe, His, Arg) с высоким химическим выходом стереоспецифическим изотопным обменом в $^2\text{H}_2\text{O}$ под действием лиофильно высушенных клеток *E. coli* В/1т7-А [61].

Синтез дейтериймеченых аминокислот

Синтетические методы получения дейтериймеченых аминокислот представляют собой, как правило, модифицированный классический синтез аминокислот, в котором стадии восстановления, гидрирования или гидролиза осуществляют в присутствии дейтерийсодержащих соединений, таких, как $^2\text{H}_2\text{O}$, $^2\text{H}_2$, ^2HCl , LiAl^2H_4 , B_2^2H_6 и др. Исторически одним из первых методов введения дейтерия в положение С2 аминокислоты является конденсация галоидных алкилов с производными аминмалонового эфира с последующим гидролизом и декарбоксилированием в растворе дейтеросоляной кислоты в $^2\text{H}_2\text{O}$ (схема 5).

Метод применим для получения 2- ^2H -меченых *DL*-аминокислот: Phe, Val, Leu, Glu, Lys, Trp, Cys(Bzl), Tug со степенью включения дейтерия выше 95% и общим выходом аминокислот не ниже 65% (62, 63). [2,2- $^2\text{H}_2$]Глицин получают непосредственно гидролизом диэтилацетамидомалоната в 6 н. ^2HCl в $^2\text{H}_2\text{O}$ с 89 - 96%-ным включением дейтерия [64] или взаимодействием [2- ^2H]бром-

малонового эфира с фталимидом калия с последующим гидролизом и декарбоксилированием в 27% ^2HCl в $^2\text{H}_2\text{O}$ [65]. В последнем случае общий выход [2,2- $^2\text{H}_2$]глицина 35 - 44%, изотопная чистота продукта 99.1%.

Использование в реакции (схема 5) [1,1- $^2\text{H}_2$]галоидных алкилов позволяет получить [2,3,3- $^2\text{H}_3$]аминокислоты (либо только [3,3- $^2\text{H}_2$]аминокислоты, если стадию гидролиза проводить в HCl в H_2O) [62, 63]. В свою очередь [1,1- $^2\text{H}_2$]бромалкилы могут быть получены восстановлением сложных эфиров LiAl^2H_4 [62] или B_2^2H_6 [66] в спирты с последующим бромированием.

S-Бензил-*DL*-[2,3,3- $^2\text{H}_3$]цистеин получают конденсацией диэтилацетамидомалоната с [1,1- $^2\text{H}_2$]метиленацетатом в присутствии диметиламина и последующей обработкой аддукта метилйодидом и далее бензилмеркаптидом натрия. Гидролиз образующегося соединения в ^2HCl в $^2\text{H}_2\text{O}$ приводит к целевому продукту со степенью введения дейтерия в положения С2 и С3 выше 95% [63].

Однако в последнее время возникла потребность в регио- и стереоспецифически дейтериймеченых аминокислотах, используемых для определения внутримолекулярных расстояний в пептидах методами одно- и двумерного ^1H -ЯМР. Получать оптически активные аминокислоты можно несколькими путями: стереоселективным изотопным обменом диастереомерных протонов в положении С2 аминокислот в их комплексах с Co(III) , использованием ферментов (микроорганизмов) или природных хиральных соединений на одной из стадий синтеза, методами хирального катализа для асимметрического синтеза, гидрирования, восстановления.

Описан метод получения *DL*-[3- ^2H]фенилаланина восстановлением [1- ^2H]бензальдегида с помощью алкогольдегидрогеназы печени до (*S*)-[1- ^2H]бензилового спирта, который превращают в соответствующий бензил-*n*-толуолсульфонат, подвергают взаимодействию с натриемалоновым эфиром, продукт реакции гидролизуют, бромруют и декарбоксилируют. Обработка амиаком полученной бромкислоты затем приводит к смеси диастереомеров [3- ^2H]фенилаланина [67].

Особо отметить следует новый метод синтеза (*R*)- и (*S*)-[2- ^2H]глицинов высокой хиральной чистоты (выше 80%) с общим выходом 40% [68], включающий асимметричное восстановление [1- ^2H]альдегидов [67, 69, 70] до соответствующих

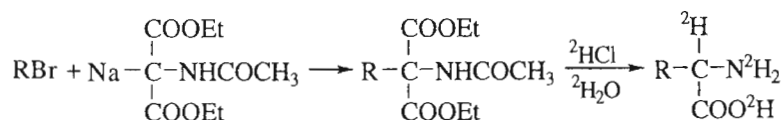


Схема 5.

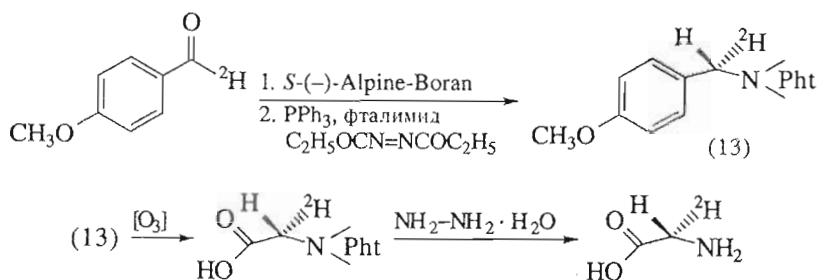


Схема 6.

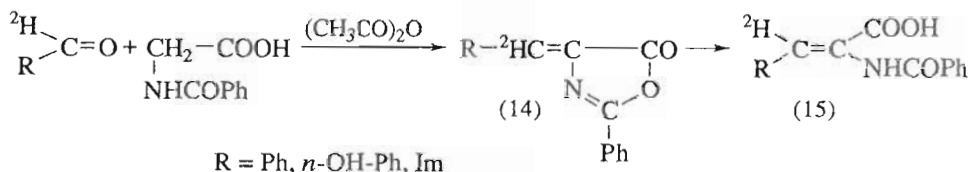


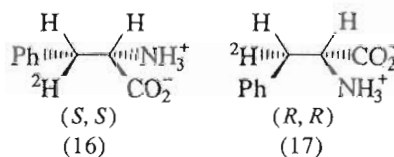
Схема 7.

хиральных [1-²H]спиртов и их стереоспецифическое одностадийное превращение в амины в присутствии алкоксифосфониевых солей с обращением конфигурации (реакция Мицунобу) [71]. Авторы работы [68] исходили из [1-²H]фурфурола или 4-метокси-[1-²H]бензальдегида. Асимметричное восстановление [1-²H]альдегидов осуществлено с помощью (*R*)- или (*S*)-В-изопинокамфенил-9-борабицикло[3.3.1]нонана ((*R*)- и (*S*)-Alpine-Boran). Затем по реакции Мицунобу получили *N*-алкилфталимид (13) 80%-ной энантиомерной чистоты [71]. Фталоильную группу удаляли обработкой соединения (13) боргидридом натрия с последующим кислотным гидролизом [72] или гидразингидратом, ароматические группы – окислением тетраоксидом рутения или озоном (CH₂Cl₂, 30% H₂O₂, -78°C) [68]. Схема 6 иллюстрирует получение (*S*)-[2-²H]глицина из 4-метокси-[1-²H]бензальдегида.

Для получения 2,3,3-²H₃-меченых ароматических аминокислот, серина, лейцина и валина достаточно широко используют конденсацию [1-²H]альдегидов (в случае валина – ацетона) с бензоилглицином в присутствии уксусного ангидрида по Эрленмейеру с последующим гидрированием ²H₂ или ¹H₂ образующихся (*Z*)-*N*^α-ациламиноакриловых кислот (15) [67, 73 - 76] (схема 7). Общий выход *N*^α-ациламино-[3-²H]акриловых кислот, получаемых по Эрленмейеру, составляет 54 - 63%. Изотопная чистота продукта не превышает 90% в результате некоторого ²H-¹H-обмена, происходящего при образовании промежуточного азлактона (14) [67].

Гидрированием *N*^α-ациламиноакриловых кислот (15) газообразным ²H₂ или ¹H₂ получают соответственно *N*^α-ацил-2,3,3-²H₃- или 3-²H-меченые аминокислоты (в случае валина и изолейцина – [2,3-²H₂]изотопмеры), конфигурация которых

зависит от природы катализатора. Металлы платиновой группы (в частности, Pd на твердых носителях, комплексы Rh, Pt, Pd, Ir, Os, Ru) катализируют *цис*-специфичное (90 - 95%) присоединение водорода к *Z*-изомеру (15), приводящее после гидролиза к рацемической смеси свободных аминокислот (16) и (17).



Метод твердофазной каталитической гидрогенизации (ТКГ) [76], заключающийся во взаимодействии газообразного водорода с соединениями (14 и 15) на твердом катализаторе Pd/BaSO₄ в отсутствие органического растворителя, используют для получения дейтериймеченых аминокислот, однако при этом наблюдается введение ²H не только в положения C2 и C3, но и в положение C4 для валина и изолейцина [76, 77].

Энантиомерно чистые (энантиомерный избыток до 95 - 99%) дейтериймеченые аминокислоты получают, используя в качестве катализаторов гидрирования оптически активные комплексы Rh(I) с фосфиновыми лигандами DIPHOS (1,2-бис(дифенилфосфино)этан), DIPAMP (1,2-бис(*o*-метоксифенилфенилфосфино)этан), DIOP (2,3-*o*-изопропилиден-2,3-дигидрокси-1,4-бис(дифенилфосфино)бутан, SAAMP (циклогексил-*o*-метоксифенилфенилфосфин) [78, 79], CHIRAPHOS (2,3-бис(дифенилфосфино)бутан) [80] (аббревиатура дана в соответствии с каталогом фирмы Aldrich), VBDP (1,4-бис(дифенилфосфино)бутан) [78], (2*S*,4*S*)-MOD-BPPM ((2*S*,4*S*)-*N*-(*трет*-бутоксикарбонил)-4-[[бис(4'-метокси-3',5'-диметил-

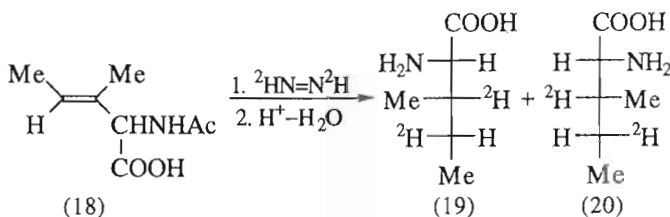


Схема 8.

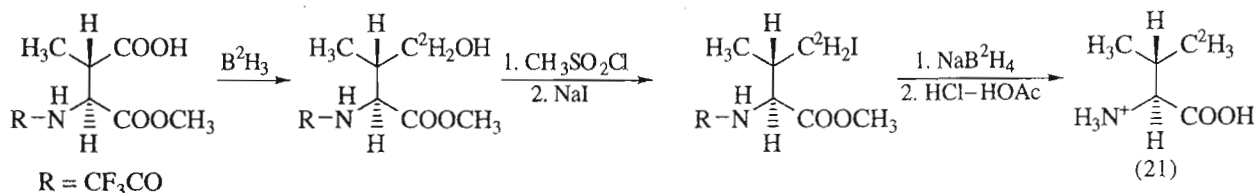


Схема 9.

фенил)]фосфино]-2-[[бис(4'-метокси-3',5'-диметил)фосфино]метил]пирролиден [81] и др. [82, 83].

Наиболее высокой оптической чистоты по вновь образованному центру меченых аминокислот (98 - 99%) удается достичь в присутствии родиевых катализаторов с метоксифенилфосфиновыми лигандами (DIPAMP, CAMP, MOD-BPPM), причем на величину энантиомерного избытка образующейся аминокислоты, кроме природы лиганда, влияет геометрия двойной связи исходной N^α-ациламиноакриловой кислоты и природа растворителя [78, 79]. Для асимметричного гидрирования применяют и арсиновые лиганды, а в качестве металлов-комплексообразователей – также Ru, Ir, Os, Pd, Pt [82, 83].

Вопросы селективности гидрирования также актуальны для синтеза аминокислот, содержащих дейтерий при C3 и C4, в частности для синтеза [3,4-²H₂]изолейцина гидрированием 2-ацетиламино-3-метилпентен-3-овой кислоты (18), которую получали с выходом всего 0.3% из соответствующего ненасыщенного альдегида по Штреккеру [84]. При проведении гидрирования N-ацетилизодолейцина (18) авторы работы [84] отдали предпочтение диимидному методу, имеющему в данной реакции четкую *цис*-стереоспецифичность (схема 8). Диимид ²HN=N²H получали при гидрировании азодикарбоксилата калия в присутствии ²H₂O и дейтероуксусной кислоты. В результате гидрирования и последующего кислотного гидролиза N-ацетилизодолейцинов образовалась рацемическая смесь изолейцинов (19) и (20).

Гидрирование кислоты (18) над 10% Pd/C приводит к смеси энантиомерных форм *алло*-изолейцина и изолейцина в отношении 51 : 49 [84].

Иной путь получения непредельной кислоты (18), отличающийся от синтеза Штреккера несколько большим выходом (12%), заключается в

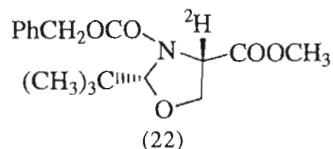
конденсации винилитиевого производного, полученного из (Z)-2-бромбутена-2, с метиловым эфиром хлорбензоилглицина [84].

Производное (2S,3R)-метиласпарагиновой кислоты применено в качестве исходного хирального соединения для синтеза (2S,3R)-[4,4,4-²H₃]валина (21) [85] (схема 9). Содержание дейтерия в положении C4 составило 78% [85].

Известны специфичные, достаточно простые и удобные методы синтеза дейтериймеченых лизина [86], серина [87] и пролина [37].

Для получения L-[5,5-²H₂]лизина бислактамное производное *cyclo*-(D-Val-Gly-) алкилируют 4-йодбутиронитрилом, восстанавливают LiAlH₄ в соответствующий амин, который гидролизуют до D-Val и L-[5,5-²H₂]лизина. Выход последнего 71% в расчете на 4-йодбутиронитрил, изотопная чистота – 99% [86].

L-[2-²H]Серин с оптической чистотой 98% и выходом 89% получен кислотным гидролизом дейтерированного хирального оксазолидина (22)



синтез которого в свою очередь включал следующие стадии: конденсацию метилового эфира гидрохлорида L-серина с триметилацетальдегидом в присутствии триметиламина, взаимодействие полученного Z-оксазолидина с литийдиизопропиламидом с образованием енолята оксазолидина и его дейтеролиз в CH₃O²H [87].

Новый способ получения [5,5-²H₂]пролина [37] заключается в циклизации L-глутаминовой кислоты и образовании из циклического амида (23) метиловых эфиров N-ацетил-5-тиопролина (24)

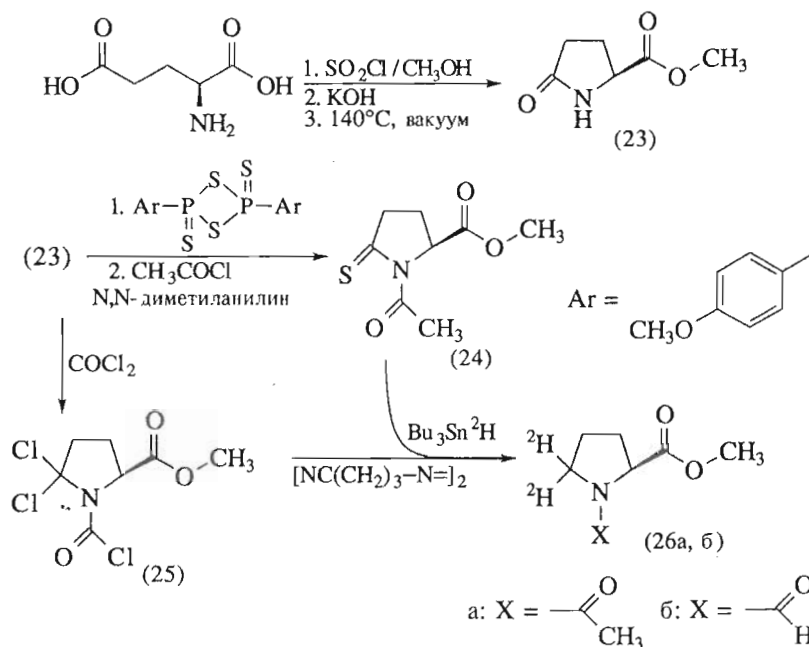


Схема 10.

(1-й вариант) или N-хлороформил-5,5-дихлорпролина (25) (2-й вариант), которые затем восстанавливают трибутилоловодейтеридом в присутствии азобисизобутиронитрила. L-[5,5-²H₂]пролин (с общим выходом 80 и 78% соответственно по 1-му и 2-му вариантам) получают гидролизом метиловых эфиров N-замещенных L-[5,5-²H₂]пролинов (26а, б) (схема 10).

Химико-ферментативные методы

Химико-ферментативный подход, включающий в себя синтетические и ферментативные стадии, оказался весьма эффективным при получении оптически активных аминокислот. Использование очищенных ферментов, бесклеточных ферментных систем, иммобилизованных ферментов, а также микробных клеток, обладающих соответствующей ферментативной активностью, – в последнее время один из основных путей синтеза аминокислот, в том числе меченных дейтерием и другими стабильными изотопами. Химико-микробиологический подход давно используется для препаративного, лабораторного и промышленного получения оптически активных аминокислот благодаря таким достоинствам ферментативных методов, как высокая селективность и возможность комплексного введения стабильных изотопов. Высокая субстратная специфичность ферментов, сложность выделения и очистки несколько ограничивают их применение. С другой стороны, развитие генно-инженерных методов открывает возможности количественного получения любых нужных ферментов.

Катализируемые ферментами реакции асимметрического образования связи на прохиральных субстратах и ферментативное разделение рацемических производных аминокислот – два основных аспекта применения ферментативных систем. Ферментативная стадия часто завершает химический синтез меченых аналогов аминокислот, причем интактные клетки микроорганизмов могут быть также эффективны для этих целей, как и очищенные ферменты.

Ферментным способом аминируют α-кетокислоты, непредельные дикарбоновые и карбоновые кислоты. В качестве кофакторов служат пиридоксальфосфат и NADP.

Традиционный подход к получению аминокислот, позволяющий вводить как дейтерий, так и другие стабильные изотопы, основан на использовании α-кетокислот в качестве метаболитических интермедиатов. Так, энзиматическое превращение синтетического фенилпирувата в фенилаланин осуществлено растущей культурой клеток *Corynebacterium glutamicum*, обладающей высокой трансминазной активностью [88]. Другие аминокислоты получены с помощью клонированной аспаратаминотрансферазы из *E. coli* (КФ 2.6.1.1) [89], причем в качестве аминокислот-доноров применены L-аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Фермент обладает широкой субстратной специфичностью, позволяющей достигнуть выхода целевых L-аминокислот с 90%-ным энантиомерным избытком. Доступность клонированной аспаратаминотрансферазы в больших количествах придает ферментативному методу получения

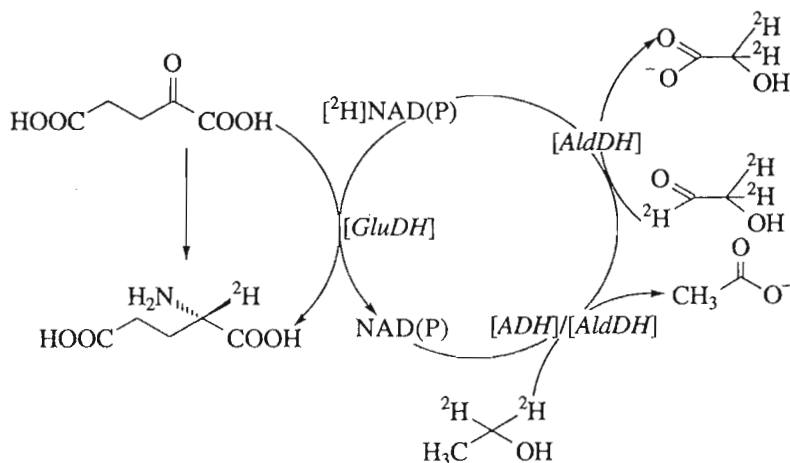


Схема 11.

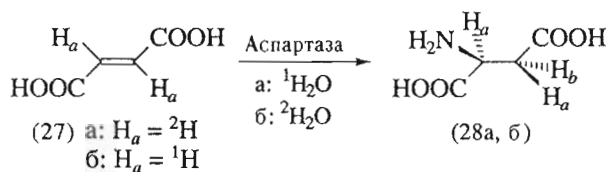


Схема 12.

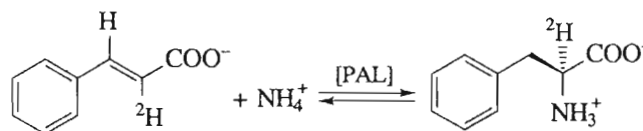


Схема 13.

дейтерированных аминокислот экономическую целесообразность.

Восстановительное аминирование α -кетоглutarовой кислоты, катализируемое глутаматдегидрогеназой (GluDH, КФ 1.4.1.2), в присутствии дейтерированного $[^2\text{H}]\text{NAD(P)}$ в качестве кофактора, используется для получения $[2\text{-}^2\text{H}]$ глутаминовой кислоты [90] (схема 11). $[^2\text{H}]\text{NAD(P)}$ регенерируют в ходе аминирования с помощью альдегиддегидрогеназы (AldDH, КФ 1.2.1.3) (субстратом является $[1,2,2\text{-}^2\text{H}_3]$ гликольальдегид) или алкогольдегидрогеназы (ADH) из дрожжей (КФ 1.1.1.1) (субстрат – $[1,1\text{-}^2\text{H}_2]$ этанол). Общий выход $[2\text{-}^2\text{H}]$ глутаминовой кислоты 91 - 96%, содержание дейтерия в положении C2 превышает 97% [90]. Аналогичную реакцию получения $L\text{-}[2\text{-}^2\text{H}]$ аланина осуществили с помощью аланиндегидрогеназы (КФ 1.4.1.1) из пировиноградной кислоты, NH_4Cl и $(4R)\text{-}[4\text{-}^2\text{H}]\text{NADH}$ [91].

Основной метод получения дейтериймеченых $(2S,3S)\text{-}[2,3\text{-}^2\text{H}_2]\text{-}$ и $(2S,3R)\text{-}[3\text{-}^2\text{H}]$ аспарагиновых кислот (28а) и (28б) – аминирование соответственно фумаровой кислоты и ее $[2,3\text{-}^2\text{H}_2]$ изотопомера в присутствии аспартазы (КФ 4.3.1.1) [92] (схема 12) или микробных клеток, обладающих аспартазной активностью [93]. Ферментативное *транс*-стереоспецифическое присоединение аминогруппы к олефину, катализируемое аспартазой, протекает с общим выходом 25 - 40% [92, 93] и характеризуется высокой оптической чистотой

целевого продукта, изотопная чистота при атомах C2 и C3 превышает 97%. Имобилизация аспартатсодержащих клеток *E. coli* в полиакриламидном геле позволила авторам работы [93] увеличить общий выход соединения (28) до 95% с сохранением изотопной и оптической чистоты.

Аминирование непредельных карбоновых кислот – удобная стадия для введения стабильной метки. Ферментативное получение $[2\text{-}^2\text{H}]$ фенилаланина из $E\text{-}[2\text{-}^2\text{H}]$ коричной кислоты, протекающее в присутствии L -фенилаланин-аммонийлиазы (PAL, КФ 4.3.1.5) (схема 13), осуществляют также и в присутствии растущей культуры клеток дрожжей *Rhodospiridium toruloides* или *Rhodotorula glutinis* [94], обладающих соответствующей активностью. Однако выход $[2\text{-}^2\text{H}]$ фенилаланина не превышает 50%.

Меченый L -тирозин был получен из DL -фенилаланина ферментативным гидроксированием с помощью фенилаланингидроксилазы (КФ 1.14.16.1) [95].

Дейтерированные аминокислоты Glu, Ser, Thr, Tug, Tpr синтезированы из других меченых аминокислот и низкомолекулярных предшественников в присутствии серингидроксилазы [60], тирозинфеноллазы (β -тирозиныазы) (КФ 4.1.99.2) [96] и триптофансинтазы (КФ 4.2.1.20) [59].

Аспарагиновые кислоты (28а, б) могут быть использованы для получения других стереоспецифически меченых аминокислот, например

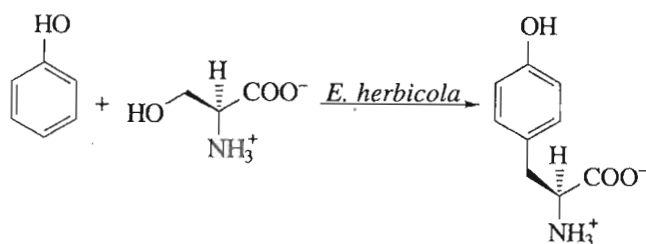


Схема 14.

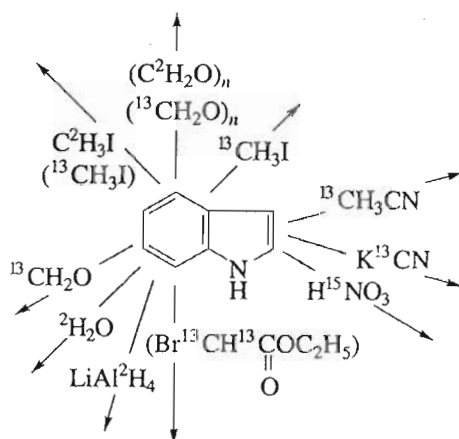


Схема 15.

(2*S*,3*R*)-[2,3-²H₂]- и (2*S*,3*S*)-[3-²H]глутаминовых кислот [92] (реакцией *N*-трифторацетильных производных кислоты (28а, б) с диазометаном и перегруппировкой Вольфа с сохранением стереохимии у атома С3 и общим выходом 38%).

Конденсация (*R*)- и (*S*)-[2-²H]глицинов с формальдегидом в присутствии серингидроксиметиллазы, пиридоксальфосфата и тетрагидрофолата приводит к соответствующим (*R*)- и (*S*)-[2-²H]серину (с сохранением конфигурации) с выходом 51% (на исходный формальдегид) и стереоспецифичностью 87% [96, 97]. Замена формальдегида на ацетальдегид в этой реакции позволяет получить (*R*)- и (*S*)-[2-²H]треонины [97].

Химико-ферментативное получение различных изотопомеров тирозина, селективно меченного ¹⁷O (¹⁸O), ¹⁵N, ¹³C и дейтерием, разработано Уолкером [98] с использованием бактерий *Erwinia herbicola* (АТСС # 21434), клетки которых обладают высокой β-тирозиной активностью [99 - 102] (схема 14).

Пиридоксальсодержащий фермент β-тирозиныза кроме образования тирозина катализирует несколько других реакций [103, 104] (например, разложение серина до пирувата и аммиака), что позволяет использовать в качестве субстрата пируват и аммоний. С использованием β-тирозинызы получен *L*-[¹⁵N]тирозин из 4-гидроксибензилпропионовой кислоты и ¹⁵N-меченого сульфата

или ацетата аммония в составе питательной среды [98, 105].

Высокая эффективность химико-микробиологического синтеза достигнута при получении 13 аналогов *L*-триптофана, специфически меченого по индольному циклу дейтерием, ¹³C и ¹⁵N [106 - 108] (схема 15).

Моноизотопномеченные индолы, а также 4-, 5- и 7-гидроксипроизводные индола были ферментативно превращены в соответствующие аналоги *L*-триптофана с помощью штамма *E. coli*, содержащего рекомбинантную плазмиду с *Tgr*-опероном, ответственным за биосинтез всех ферментов, необходимых для получения триптофана [109].

Образование триптофана в растениях и микроорганизмах [110, 111] протекает через ключевые интермедиаты – анраниловую кислоту и индол с ферментативным присоединением серина на последней стадии биосинтеза [110]. Меченые аналоги индола и анраниловой кислоты были использованы для препаративного получения изотопномеченого *L*-триптофана [106, 107].

Ферментативное аминирование α-кетокислот [112], как и многие другие реакции, осуществляют и с применением иммобилизованных ферментов, например иммобилизованной глутаматдегидрогеназы [113] (получение γ-аминоасляной кислоты), иммобилизованной аланиндегидрогеназы в присутствии NADH (получение меченого *L*-аланина из молочной кислоты) [114], а также иммобилизованной на сефарозе трансаминазы при получении меченого фенилаланина [115].

Ферментативное расщепление рацемических производных аминокислот ацилазами, амидазами, гидантоиназами, нитрилазами и нитрилгидратазами применяют достаточно часто (см. [116] и цитируемую там литературу). В случае меченых рацемических смесей предпочтительно прибегают к таким методам получения, которые исключают потерю половины дорогостоящего вещества на последней стадии синтеза, несмотря на то что возможно превращение невостребованного изомера в рацемат и повторное ферментативное разделение последнего.

Хроматографическое разделение рацематов на прохиральных сорбентах предложено для многих производных аминокислот [117], но таким способом можно получить в лучшем случае лишь один из оптических антиподов меченого продукта.

Биосинтетическое получение дейтериймеченых аминокислот

Биосинтетический способ получения меченых аминокислот культивированием микроводорослей и других микроорганизмов на средах, содержащих низкомолекулярные меченые субстраты, часто рассматривают как альтернативу синтетическим

методам, приводящим к рацемическим продуктам. Для структурных исследований белка, требующих равномерного обогащения образца дейтерием или другим изотопом, а также для гетероизотопного мечения биосинтетический способ обеспечивает сравнительно недорогое получение нужного количества меченых аминокислот (или меченого белка).

Начиная с первых работ по культивированию микроводорослей на тяжелой воде (см., например, [27, 118] и цитируемые там работы), для биосинтетического получения дейтериймеченых веществ использовали два основных подхода: метаболическое включение дейтерия (или других изотопов) за счет культивирования автотрофных микроорганизмов в водных средах и включение дейтерия гетеротрофными микроорганизмами, требующими более сложных изотопомеченых субстратов, например меченых предшественников аминокислот. Наиболее дешевым и доступным источником дейтерия для сред культивирования микроорганизмов является дейтеровода, могут быть использованы и другие меченые реактивы (например, дейтерометанол для метилотрофных бактерий [119]). Направленность биосинтетического включения метки в молекулу зависит от метаболических путей. Несмотря на токсичность дейтерия для клеток, многие растительные микроорганизмы могут быть легко адаптированы к высоким концентрациям (99.9%) тяжелой воды, в то время как высшие растения способны выдерживать не более 60% $^2\text{H}_2\text{O}$, а животные не более 30% [118].

Дейтерированная биомасса микроводорослей и других микроорганизмов – ценный источник многих меченых аминокислот и других биологически активных веществ. Переработка гидролизатов белка тотально меченой биомассы обеспечивает широкий набор дейтериймеченых аминокислот, которые коммерчески доступны в препаративных количествах. Основным достоинством биосинтетического подхода является, безусловно, получение аминокислот в оптически активной природной форме.

Наиболее перспективным представляется использование микроорганизмов-продуцентов определенных аминокислот, например лизина, глутаминовой кислоты. Большинство других меченых аминокислот могут быть получены разделением гидролизатов белка, что связано с трудоемким и неэффективным для некоторых пар аминокислот хроматографическим разделением [45, 120]. Тем не менее возможность такого разделения продемонстрирована для ^2H , ^{15}N -меченых аминокислот с помощью препаративной ионообменной хроматографии [120]. Биосинтетически меченый дейтерием и ^{15}N белок биомассы бактерий был подвергнут гидролизу и последующему разделению.

Из 15 г гидролизата с помощью системы ионообменных колонок удалось выделить 17 меченых аминокислот в индивидуальном виде. При этом, согласно данным масс-спектрометрии и ЯМР, обогащение аминокислот ^{15}N составило около 95%, а дейтерием – около 97%. Как и следовало ожидать, исключение составляет β -положение аспарагиновой кислоты, γ - – глутаминовой кислоты и *мета*-положение тирозина, обогащение которых равно 90%, что объясняется равновесным характером обмена с растворителем в ходе гидролиза. Подвижные атомы дейтерия в положении С2 имидазольного кольца гистидина легко обмениваются на протоны воды при выделении.

Таким образом, для получения дейтериймеченых аминокислот могут быть использованы различные подходы в зависимости от требуемого положения метки, вводимой в молекулу.

Полностью дейтерированные *L*-аминокислоты целесообразнее получать биосинтетическим путем, используя, например, меченую биомассу микроводорослей. Для селективного введения дейтерия по определенному положению молекулы предпочтительнее использовать синтетические и ферментативные методы. Изотопный обмен водорода имеет очевидные преимущества при введении дейтерия в ароматическую часть молекулы аминокислоты или в положение С2. Например, для получения *L*-фенилаланина, меченого дейтерием по ароматическому кольцу, используют ^1H - ^2H -обмен в концентрированной дейтеросерной кислоте; *L*-[3- ^2H]фенилаланин получают конденсацией [1- ^2H]бензальдегида с бензоилглицином; *L*-[2- ^2H]фенилаланин – ^1H - ^2H -обменом в комплексах Со(III); для получения полностью дейтерированного фенилаланина целесообразно использовать фенилаланинсекретирующий продуцент или гидролизаты дейтериймеченого белка биомассы микроорганизмов. Таким образом, при имеющемся разнообразии методов получения дейтериймеченых оптически активных аминокислот выбор метода диктуется прежде всего целью исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Griffey R.H., Redfield A.G. // Q. Rev. Biophys. 1987. V. 19. P. 51 - 82.
2. Irving C.C., Klein P.D., Navratil P.R., Boulton T.W. // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 2172 - 2178.
3. Furuta T., Katayama M., Shibasaki H., Kasuya Y. // J. Chromatogr. 1992. V. 576. P. 213 - 219.
4. Lee E.S., Majkowski R.F., Partin D.L. // US Patent. 1987. № 4684805.
5. Schulz G.E., Schirmer R.H. Principals of Protein Structure. B.: Springer-Verlag, 1979. P. 3 - 45.
6. Blundell T.L., Johnson L.N. Protein Crystallography. N.Y.: Acad. Press, 1976. P. 6 - 87.

7. Campbell I.D., Sheard B. // Trends Biotechnol. 1987. V. 5. P. 302 - 306.
8. Harbison G.S., Smith S.O., Pardo J.A., Courtin J.M.L., Lugtenburg J., Herzfeld J., Mathies R.A., Griffin R.G. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 6955 - 6962.
9. Harbison G.S., Smith S.O., Pardo J.A., Mulder P.P.J., Lugtenburg J., Herzfeld J., Mathies R.A., Griffin R.G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 1706 - 1709.
10. Эрнст Р., Боденхаузен Дж., Вокаун А. ЯМР в одном и двух измерениях. М.: Мир, 1990.
11. Wüthrich K. // NMR of Proteins and Nucleic Acids. N.Y.: John Wiley and Sons, 1986.
12. Clore G.M., Gronenborn A.M. // Protein Eng. 1987. V. 1. P. 275 - 288.
13. Oh B.H., Westler W.M., Darba P., Markley J.L. // Science. 1988. V. 240. P. 908 - 911.
14. Torchia D.A., Sparks S.W., Bax A. // J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 2320 - 2321.
15. Bogusky M.J., Tsang P., Opella S.J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 127. P. 540 - 545.
16. Senn H., Otting G., Wüthrich K. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 1090 - 1092.
17. LeMaster D.M., Richards F.R. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 142 - 150.
18. Kannar A., Ernst R.R., Wüthrich K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 95. P. 1 - 9.
19. Nagayama K., Kumar A., Wüthrich K., Ernst R.R. // J. Magn. Reson. 1980. V. 40. P. 321 - 325.
20. Bax A., Drobny-G. // J. Magn. Reson. 1985. V. 61. P. 306 - 311.
21. Davis D.G., Bax A. // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V. 107. P. 2820 - 2826.
22. LeMaster D.M. // FEBS Lett. 1988. V. 223. P. 191 - 196.
23. LeMaster D.M. // FEBS Lett. 1988. V. 233. P. 326 - 330.
24. LeMaster D.M. // Meth. Enzymol. 1989. V. 177. P. 23 - 43.
25. LeMaster D.M., Richards F.M. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 142 - 150.
26. Lapidot A., Kahana Z.E. // Trends Biotechnol. 1986. V. 4. P. 2 - 4.
27. Crespi H.L. // Stable Isotopes in the Life Sciences / Ed. Freeman S.M. Vienna: Int. Atomic Energy Agency, 1977. P. 111 - 121.
28. Matthews H.R., Matthews K.S., Opella S.J. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 497. P. 1 - 13.
29. Kinsey R.A., Kintanar A., Oldfield E. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 17. P. 9028 - 9036.
30. Cohen J.S., Feil M., Chaiken I.M. // Biochim. et biophys. acta. 1971. V. 236. P. 468 - 478.
31. Bak B., Led J.J., Pedersen E.J. // Acta chem. scand. 1969. V. 23. P. 3051 - 3054.
32. Пшеничникова А.Б., Карнаухова Е.Н., Мишнер Б.И., Дубовский П.В., Швец В.И. // Журн. общей химии. 1993. Т. 63. № 5. С. 1034 - 1040.
33. Bradbury J.H., Grompton M.W., Ten J.S. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 81. № 2. P. 411 - 422.
34. Buncel E., Jones J.R., Joly H.A., Onyido I. // Proc. of the 3d Int. Sympos. Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds / Eds Baillie T.A., Jones J.R. Elsevier, 1989. P. 219 - 222.
35. Griffiths D.V., Feeney J., Roberts G.C., Burgen A.S. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 446. P. 479 - 485.
36. Furata T., Kasuya Y., Takahashi H., Baba S. // J. Chem. Res. (S). 1987. P. 86 - 91.
37. Cappon J.J. Ph. D. Thesis University of Leiden, The Netherlands/Pasmans Offsetdrukkerij B.V. Haag., 1993. P. 127.
38. Norton S., Bradbury J.H. // Mol. Cell. Biochem. 1976. V. 12. № 2. P. 103 - 111.
39. Kanska M., Drabarek S. // Radiochem. Radioanal. Lett. 1980. V. 44. № 4. P. 207 - 210.
40. Kanska M. // J. Radioanal. Nucl. Chem. 1988. V. 87. P. 95 - 100.
41. Woodworth R.S., Dobson C.M. // FEBS Lett. 1979. V. 101. № 2. P. 329 - 332.
42. Золотарев Ю.А., Зайцев Д.А., Татур В.Ю., Мясоедов Н.Ф. Способ получения равномоленных дейтерием оптически активных α -аминокислот: А. с. 1685903 СССР // Б. И. 1991. № 39. С. 92.
43. Золотарев Ю.А., Козик В.С., Зайцев Д.А., Дорохова Е.М., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 308. № 5. С. 1146 - 1150.
44. Кумарев В.П., Алманов Г.А. // Журн. физ. химии. 1975. Т. 49. № 5. С. 1361.
45. Cohen J.S., Putter I. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 222. P. 515 - 520.
46. Johns R.B., Whelan D.J. // Aust. J. Chem. 1966. V. 19. P. 2143 - 2147.
47. Tenenbaum S.W., Witherup T.H., Abbott E.H. // Biochim. et biophys. acta. 1974. V. 362. P. 308 - 315.
48. Upson D.A., Hruby V.J. // J. Org. Chem. 1977. V. 42. № 13. P. 2329 - 2330.
49. Fujihara H., Schowen R.L. // J. Org. Chem. 1984. V. 49. № 15. P. 2819 - 2820.
50. Keyes W.E., Legg J.I. // J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 96. № 16. P. 4970 - 4975.
51. Belokon Yu.N., Melikyan A.S., Savel'eva T.F., Bakhmutov V.I., Vitt S.V., Belikov V.M. // Tetrahedron. 1980. V. 36. P. 2327 - 2335.
52. Belokon Yu.N., Maleyev V.I., Vitt S.V., Ryzhov M.G., Kondrashov Y.D., Golubev S.N., Vauchskii Y.P., Kazika A.I., Novikova M.I. // J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1985. № 1. P. 17 - 26.
53. Reider P.J., Conn R.S.E., Davis P., Grenda V.J., Gambito A.J., Grabowski E.J.J. // J. Org. Chem. 1987. V. 52. № 15. P. 3326 - 3334.
54. Belokon Yu.N., Belikov V.M., Vitt S.V., Savel'eva T.F., Burbelo V.M., Bakhmutov V.I., Aleksandrov G.G., Struchkov Yu.T. // Tetrahedron. 1977. V. 33. № 19. P. 2551 - 2564.
55. Meese C.O., Specht D., Hofmann U. // Arch. Pharm. 1990. V. 323. P. 957 - 965.
56. Rosegay A., Taub D. // Synth. Commun. 1989. V. 19. № 7. P. 1137 - 1145.
57. Furata T., Katayama M., Shibasaki H., Kasuya Y. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1992. № 13. P. 1643 - 1648.
58. Gout E., Chesne S., Beguin C.G., Pelmont J. // Biochem. J. 1978. V. 171. P. 719 - 723.
59. Miles E.W., McPhie P. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 9. P. 2852 - 2857.

60. Jordan P.M., Akhtar M. // Biochem. J. 1970. V. 116. P. 277 - 286.
61. Фалеев Н.Г., Рувинов С.Б., Сапоровская М.Б., Беликов В.М., Закомырдина Л.И., Сахарова И.С., Торчинский Ю.М. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1989. № 10. С. 2341 - 2343.
62. Yamamoto D.M., Upson D.A., Linn D.K., Hruby V.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1977. V. 99. № 5. P. 1564 - 1570.
63. Upson D.A., Hruby V.J. // J. Org. Chem. 1976. V. 41. № 8. P. 1353 - 1358.
64. Blomquist A.T., Hiscock B.F., Harpp D.N. // J. Org. Chem. 1966. V. 31. № 1. P. 338 - 339.
65. Engelman H., Niclas H., Dauert A. Verfahren zur Herstellung von Glycin-D₅ mit hoher Isotopenanreicherung: Патент ГДР. 1989. № 263191 // Р. Ж. Химия. 1989. № 21. 210155П.
66. Kluender H., Huang Fu-Chih, Fritzberg A., Schnoes H., Sih C.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. № 12. P. 4054 - 4055.
67. Wightman R.H., Staunton J., Battersby A.R., Hanson U.R. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1972. P. 2364 - 2372.
68. Ramalingam K., Nanjappan P., Kalvin D.M., Woodard R.W. // Tetrahedron. 1988. V. 44. № 17. P. 5597 - 5604.
69. Seebach D., Erickson B.W., Singh G. // J. Org. Chem. 1966. V. 31. P. 4303 - 4304.
70. Kirby G.W., Michael J. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1973. P. 115 - 120.
71. Mitsunobu O., Wada M., Sano T. // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. № 2. P. 679 - 680.
72. Osby J.O., Martin M.G., Ganem B. // Tetrahedron Lett. 1984. V. 25. № 20. P. 2093 - 2096.
73. Battersby A.R., Nicoletti M., Staunton J., Vleggaar R. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1980. P. 43 - 51.
74. Kirby G.W., Michael J., Narayanaswati S. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1972. P. 203 - 205.
75. Mosberg H.I., Sobczyk-Kojiro K., Subramanian P., Crippen G.M., Ramalingam K., Woodard R.W. // J. Amer. Chem. Soc. 1990. V. 112. № 2. P. 822 - 829.
76. Zolotarev Yu.A., Kozik V.S., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F. // J. Labelled Compounds and Radiopharm. 1991. V. XXIX. № 9. P. 997 - 1007.
77. Zolotarev Yu.A., Kozik V.S., Dorokhova E.M., Tatur V.Yu., Rosenberg S.G., Myasoedov N.F. // J. Labelled Compounds and Radiopharm. 1992. V. XXXI. № 1. P. 71 - 75.
78. Koenig K.E., Knowles W.S. // J. Amer. Chem. Soc. 1978. V. 100. № 24. P. 7561 - 7564.
79. Vineyard B.D., Knowles W.S., Sabacky M.Y., Bachman G.L., Weinkauff D.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1977. V. 99. № 18. P. 5946 - 5952.
80. Fruzuk M.D., Bosnich B. // J. Amer. Chem. Soc. 1977. V. 99. № 19. P. 6262 - 6267.
81. Takahashi H., Achiwa K. // Chem. Lett. 1989. № 2. P. 305 - 308.
82. Авирон-Виле П. Способ получения оптически активных аминокислот: Пат. 615852 СССР // Б. И. 1978. № 26. С. 207.
83. Ноулз У.С., Сэвэки М.Д. Способ получения d- или l-изомеров α-аминокислот: Пат. 640659 СССР // Б. И. 1978. № 48. С. 231.
84. Cahill R., Crout D.H.G., Gregorio M.V.M., Mitchell M.B., Muller U.S. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1983. P. 173 - 180.
85. Kluender, Huang F.-C., Fritzberg A., Schnoes H., Sih C.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. № 12. P. 4054 - 4055.
86. Raap J., van der Wielen C.M., Lugtenburg J. // Recueil trav. chim. Pays-Bas. 1990. V. 109. № 4. P. 277 - 286.
87. Seebach D., Aebi J.D. // Tetrahedron Lett. 1984. V. 25. № 24. P. 2545 - 2548.
88. Bulot E., Cooney C.L. // Biotechnol. Lett. 1985. V. 7. № 2. P. 93 - 98.
89. Baldwin J.E., Dyer R.L., Ng S.C., Pratt A.J., Ruszel M.A. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. P. 3745 - 3748.
90. Wong C.-H., Whitesides G.M. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. № 15. P. 5012 - 5014.
91. Tanaka H., Ezaki N. // Jpn. Kokai, JP 63, 219, 391 [88, 219, 391]. 1988. Chem. Abstr. 1989. V. 110. 113237r.
92. Field S.J., Young D.W. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979. V. 1163 - 1165.
93. Lee K.-M., Ramalingam K., Son J.-K., Woodard R.W. // J. Org. Chem. 1989. V. 54. № 13. P. 3195 - 3198.
94. Hadener A., Tamm Ch. // J. Labelled Compounds and Radiopharm. 1987. V. 24. P. 1291 - 1306.
95. Voore A.C. Ph. D. Dissertation, University of California, Berkley, 1976.
96. Fuganti C., Ghiringhelli D., Giangrasso D., Grasselli P. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1974. P. 726 - 727.
97. Skye G.E., Potts R., Floss H.G. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. № 5. P. 1593 - 1598.
98. Walker T.E., Matheny C., Storm C.B., Hayden H. // J. Org. Chem. 1986. V. 51. P. 1175 - 1179.
99. Enei H., Matsui H., Okumura S. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1971. V. 43. P. 1345 - 1348.
100. Ogata K., Yamada H., Enei H., Okumura S. U.S. Patent. 1974. № 3791924.
101. Enei H., Matsui H., Nakazawa H., Okumura S., Yamada H. // Agric. Biol. Chem. 1973. V. 37. P. 493.
102. Arndt K.T., Boschelli F., Lu P., Miller J.H. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 6109 - 6118.
103. Kumagai H., Kashima N., Torii H., Yamada H., Enei H., Okumura S. // Agric. Biol. Chem. 1972. V. 36. P. 472 - 475.
104. Nagasawa T., Utagawa T., Goto J., Kim C., Tani Y., Kumagai H., Yamada H. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. P. 33 - 40.
105. Enei H., Nakazawa H., Matsui H., Okumura S., Yamada H. // FEBS Lett. 1971. V. 21. P. 39 - 42.
106. van den Berg E.M.M., Baldew A.U., de Goede A.T.J.W., Raap J., Lugtenburg J. // Recueil trav. chim. Pays-Bas. 1988. V. 107. P. 73 - 81.
107. van den Berg E.M.M., van Liemt W.B.S., Heemskerk A., Lugtenburg J. // Recueil trav. chim. Pays-Bas. 1989. V. 108. P. 304 - 313.
108. Enger-Valk B.E., Heyneker H.L., Oosterbaan R.A., Poulos W. // Gene. 1980. V. 9. P. 69 - 82.

109. *Conn E.E.* The Shikimic Acid Pathway. N.Y.: Plenum Press, 1986.
110. *Drewe W.F., Dunn M.F.* // *Biochemistry*. 1986. V. 25. P. 2494 - 2501.
111. *Bulot E., Cooney C.L.* // *Biotechnol. Lett.* 1985. V. 7. № 2. P. 93 - 98.
112. *Passerat N., Bolte J.* // *Tetrahedron Lett.* 1987. V. 28. P. 1277 - 1280.
113. *Lambrecht R.H.D., Slegers G., Mannens G., Claves A.* // *Enzyme Microb. Technol.* 1987. V. 9. P. 221 - 225.
114. *Prescan E., Ivanof A., Mocanu A., Palibroda N., Bologa M., Gorun V., Oarga M., Barzu O.* // *Enzyme Microb. Technol.* 1987. V. 9. P. 663.
115. *Haldin C., Langstrom B.* // *J. Labelled Compounds and Radiopharm.* 1986. V. 23. № 7. P. 715 - 722.
116. *Williams R.M.* Synthesis of Optically Active α -Amino Acids. Oxford: Pergamon Press, 1989. P. 257 - 272.
117. Хроматография. Т. 1. / Ред. Э. Хефтман. М.: Мир, 1986.
118. *Katz J.J., Crespi H.L.* / *Science*. 1966. V. 151. P. 1187 - 1191.
119. *Karnaikhova E.N., Reshetova O.S., Semenov S.Y., Skladnev D.A., Tsygankov Y.D.* // *Amino Acids*. 1994. V. 6. № 2. P. 165 - 176.
120. *LeMaster D.M., Richards F.M.* // *Anal. Biochem.* 1982. V. 122. P. 238 - 247.

Methods for Preparation of Deuterated Amino Acids (Review Articles)

A. B. Pshenichnikova*, E. N. Karnaukhova, E. N. Zvonkova, and V. I. Shvets
Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

Abstract – The current state and prospects for the application of amino acids labeled with stable isotopes are considered. Methods for preparation of deuterated amino acids, including synthetic, chemico-enzymatic, biosynthetic ones, and deuterium exchange reactions are systematized. Problems of preparation of optically pure amino acids are discussed.

Key words: deuterated amino acids, deuterium exchange, chemical synthesis, enzymatic preparation, biosynthesis.

* To whom correspondence should be addressed.