

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ № 2 2016
СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК

УДК 547.466

Е. И. ГОРДАШНИКОВА, В. А. ГАЙДУКЕВИЧ, Л. А. ПОПОВА, В. А. КНИЖНИКОВ

ПРЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ L-ПРОЛИЛ-L-ЛЕЙЦИЛГЛИЦИНА

*Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: knizh@ifoch.bas-net.by*

L-пролил-L-лейцилглицин получен из L-пролил-L-лейцина с использованием для наращивания пептидной цепи методов активированных эфиров или смешанных ангидридов.

Ключевые слова: L-пролил-L-лейцилглицин, активированный эфир, смешанный ангидрид.

H. I. GORDASHNIKOVA, V. A. GAIDUKEVICH, L. A. POPOVA, V. A. KNIZHNIKOV

PREPARATIVE SYNTHESIS OF PROLYLLEUCYLGLYCINE

*Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: knizh@ifoch.bas-net.by*

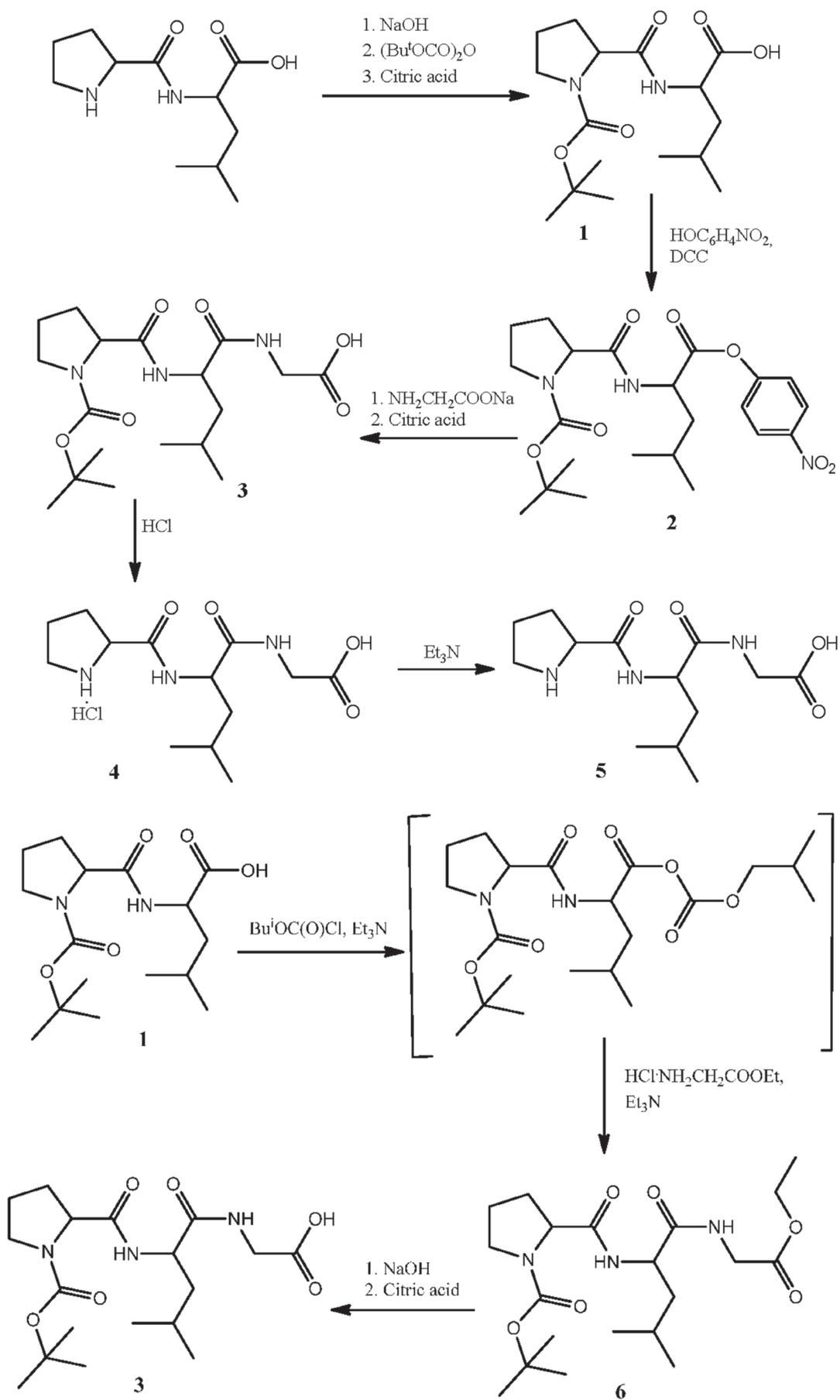
Using methods of activated esters or mixed anhydrides to increase peptide chain, L-prolyl-L-leucylglycine has been prepared from L-prolyl-L-leucine.

Keywords: L-prolyl-L-leucylglycine, activated ester, mixed anhydride.

Ряд соединений, содержащих в своем составе фрагмент -Pro-Leu-, обладает высокой биологической активностью [1–5] и может быть использован для создания новых лекарственных средств. Поэтому разработка удобных препаративных способов синтеза соединений этого типа является актуальной задачей. Для получения значительных количеств высокочистых пептидов важным является как выбор оптимальной комбинации защитных групп, так и последовательность и способ наращивания пептидной цепи. Цель настоящей работы – выбор оптимального пути получения L-пролил-L-лейцилглицина.

В литературе описан синтез ряда производных пептидов, содержащих фрагмент -Pro-Leu-GlyNH₂ [6]. Для получения этих соединений авторы работы использовали стратегию последовательного наращивания цепи с помощью метода смешанных ангидридов. Для синтеза L-пролил-L-лейцилглицина нами была выбрана стратегия фрагментной конденсации с использованием в качестве исходного соединения L-пролил-L-лейцина, для которого ранее нами был разработан удобный метод получения, основанный на использовании трифторацетильной аминокзащитной группы [7].

Взаимодействием натриевой соли L-пролил-L-лейцина с ди-*трет*-бутилдикарбонатом с последующим подкислением реакционной смеси лимонной кислотой получен *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцин (1), конденсация которого с 4-нитрофенолом под действием дихлорогексилкарбодиимида дает 4-нитрофениловый эфир *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцина (2). Обработка этанольного раствора соединения (2) избытком натриевой соли глицина и последующее подкисление реакционной смеси лимонной кислотой приводят к образованию *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцилглицина (3). Удаление *трет*-бутилоксикарбонильной защитной группы под действием раствора хлористого водорода в диоксане и обработка образующегося при этом гидрохлорида L-пролил-L-лейцилглицина (4) эквимолекулярным количеством триэтиламина приводят к целевому L-пролил-L-лейцилглицину (5).



Следует отметить, что выделяемый из реакционной смеси *трет*-бутил-оксикарбонил-L-пролил-L-лейцилглицин содержит примеси 4-нитрофенола, которые полностью отделяются от целевого продукта на стадии выделения гидрохлорида L-пролил-L-лейцилглицина.

Для синтеза L-пролил-L-лейцилглицина в настоящей работе был использован и метод смешанных ангидридов. Так, добавление триэтиламина к смеси смешанного ангидрида, полученного из *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцина и *изо*-бутилхлорформиата и вводимого в дальнейшие превращения без выделения из реакционной смеси в индивидуальном виде, и гидрохлорида этилового эфира глицина при температуре $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ приводит к образованию этилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцилглицина (**6**). Обработкой этанольного раствора соединения (**6**) водным раствором гидроксида натрия с последующим подкислением реакционной смеси лимонной кислотой получено производное (**3**), которое описанным выше способом переведено в целевой трипептид (**5**).

Строение синтезированных соединений подтверждено данными ИК, ЯМР спектров и элементного анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все операции проведены с использованием безводных органических растворителей. Гидрохлорид этилового эфира глицина получали по стандартной методике [8]. L-пролил-L-лейцин получен по методике, описанной в работе [7]. Выделенные из реакционных смесей промежуточные соединения использовали без дополнительной очистки. ИК-спектры соединений записаны на ИК Фурье спектрофотометре Protégé-460 с приготовлением образцов в виде таблеток с КВг. Спектры ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C регистрировали на спектрометре Bruker «Avance-400», химические сдвиги протонов измерены относительно сигналов остаточных протонов растворителей. Оптическая активность соединений измерена на поляриметре Polamat A.

Трет-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцин (1). К раствору 4,16 г (104 ммоль) гидроксида натрия в 100 мл воды при перемешивании добавляли 22,8 г (100 ммоль) пролил-лейцина, раствор 5,2 г гидрокарбоната натрия в 160 мл воды, 100 мл этанола и 28,38 г (130 ммоль) ди-*трет*-бутилдикарбоната. К реакционной смеси при перемешивании в течение 4 ч порциями добавляли 150 мл этанола. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч. Этанол удаляли при пониженном давлении, образовавшуюся смесь промывали гексаном (3×150 мл) и водную фазу подкисляли лимонной кислотой $\text{pH} \sim 3,5$. Продукт реакции экстрагировали этилацетатом (3×10 мл). Органические вытяжки объединяли, сушили над сульфатом магния и растворитель удаляли при пониженном давлении. После переосаждения из эфира гексаном получали 26,2 г (80%) соединения (**1**), т. пл. $66\text{--}68\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -45,3^{\circ}$ ($c = 2,8$; MeOH). ИК-спектр, $\nu\text{ см}^{-1}$: 1753, 1703, 1666 (C=O), 1545 ($\text{NH}_{\text{амид}}$). ЯМР ^1H спектр (дейтерохлороформ), δ м.д.: 0,81 уш.с (6H), 1,12–1,18 м (1H), 1,32 с (9H), 1,46–1,57 м (3 H), 1,75–1,98 м (3 H), 3,23–3,37 м (2 H), 4,20–4,24 м (1H), 4,46–4,51 м (1H). ЯМР ^{13}C спектр (дейтерохлороформ), δ м.д.: 21.55, 22.50, 22.77, 24.51, 28.09, 31.39, 41.05, 46.87, 50.53, 59.53, 80.55, 155.13, 172.23, 175.31. Найдено, %: C 58,77, H 8,85, N 8,37, $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, %: C 58,52, H 8,59, N 8,53.

4-Нитрофениловый эфир трет-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцина (2). К раствору 16,4 г (50 ммоль) *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцина в 150 мл тетрагидрофурана при интенсивном перемешивании последовательно добавляли раствор 10,72 г (52 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 150 мл тетрагидрофурана и 7,23 г (52 ммоль) 4-нитрофенола в 100 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток промывали гексаном и сушили в вакууме. Получали 19,1 г (85%) соединения (**2**), т. пл. $113\text{--}114\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -49,3^{\circ}$ ($c = 3,1$; MeOH). ИК-спектр, $\nu\text{ см}^{-1}$: 1769, 1679, 1661 (C=O); 1528, 1349 (N-O). ЯМР ^1H спектр (дейтерохлороформ), δ м. д.: 0,94 уш.с (6H), 1,38 с (9H), 1,67–1,91 м (6H), 2,04–2,14 м (1H), 3,29–3,46 м (2H), 4,25–4,32 м (1H), 4,60–4,72 м (1H), 7,22 д (J 9 Гц, 2H), 8,18 д (J 9,5 Гц, 2H). ЯМР ^{13}C спектр (дейтерохлороформ), δ м.д.: 21.39, 22.66, 24.68, 28.06, 31.31, 33.61, 40.32, 46.95, 51.16, 59.26, 80.43, 122.12, 124.97,

140.35, 145.21, 155.12, 163.22, 170.26. Найдено, %: С 58,97, Н 7,18, N 9,48. $C_{22}H_{31}N_3O_7$. Вычислено, %: С 58,78, Н 6,95, N 9,35.

Этиловый эфир *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцилглицина (6). К охлажденному до -15°C раствору 16,4 г (50 ммоль) *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцина в 300 мл хлористого метилена добавляли 5,45 г (54 ммоль) триэтиламина. Смесь перемешивали 15 мин. К полученному раствору добавляли охлажденный раствор 7,38 г (54 ммоль) *изо*-бутилхлорформиата в 50 мл хлористого метилена и перемешивание продолжали в течение 30 мин при -15°C . К реакционной смеси последовательно добавляли охлажденную суспензию 7,62 г (55 г ммоль) гидрохлорида этилового эфира глицина и 5,56 г (55 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали при температуре -12°C в течение 3 ч, охлаждение снимали и перемешивание продолжали в течение 10 ч. Полученную смесь промывали водой (3×100 мл), органические вытяжки сушили сульфатом натрия и растворитель удаляли на вакуумном роторном испарителе. Остаток растворяли в 50 мл эфира, раствор фильтровали, к фильтрату добавляли 60 мл гексана и смесь выдерживали при температуре 0°C в течение 12 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали гексаном и сушили в вакууме. Получали 15,1 г (73%) соединения (6), т. пл. $104\text{--}105^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} = -76,9^{\circ}$ ($c = 2,8$, MeOH). ИК-спектр, ν см^{-1} : 1760, 1744, 1698, 1647 (C=O), 1548 ($\text{NH}_{\text{амид}}$). ЯМР ^1H спектр (дейтерохлороформ), δ м. д.: 0,80 д (J 7,5 Гц, 3H), 0,82 д (J 7,0 Гц, 3H), 1,16 т (J 7,5 Гц, 3H), 1,35 с (9H), 1,42–1,57 м (2H), 1,62–1,70 м (1H), 1,73–1,83 м (2H), 1,88–2,12 м (2H), 3,28–3,40 м (2H), 3,78–3,91 м (2H), 4,07 к (J 7 Гц, 2H), 4,15–4,22 м (1H), 4,37–4,44 м (1H). ЯМР ^{13}C спектр (дейтерохлороформ), δ м.д.: 14.08, 21.52, 23.06, 24.75, 28.27, 28.56, 40.39, 41.21, 47.20, 51.58, 60.34, 61.20, 80.70, 155.99, 169.59, 172.30, 172.85. Найдено, %: С 58,26, Н 8,71, N 10,03. $C_{20}H_{35}N_3O_6$. Вычислено, %: С 58,09, Н 8,53, N 10,16.

***Трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцилглицин (3).** К раствору 20,68 г (50 ммоль) этилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцилглицина в 70 мл этанола добавляли раствор 2,2 г (55 ммоль) гидроксида натрия в 75 мл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 ч, этанол отгоняли при пониженном давлении, полученную смесь фильтровали и фильтрат подкисляли лимонной кислотой до pH 4. Продукт реакции экстрагировали этилацетатом, органические вытяжки сушили сульфатом натрия, полученный раствор фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. После переосаждения из эфира гексаном получали 14,65 г (76%) соединения (3), т. пл. $85\text{--}86^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} = -62,5^{\circ}$ ($c = 3,5$, MeOH). ИК-спектр, ν см^{-1} : 1731, 1700, 1676, 1645 (C=O); 1545, 1523 ($\text{NH}_{\text{амид}}$). ЯМР ^1H спектр (дейтерохлороформ), δ м. д.: 0,82 д (J 7,2 Гц, 6H), 1,36 уш.с (9H), 1,46–1,65 м (3H), 1,72–2,01 м (3H), 2,03–2,17 м (1H), 3,27–3,43 м (2H), 3,88–4,07 м (2H), 4,15–4,29 м (1H), 4,50–4,71 м (1H). ЯМР ^{13}C спектр (дейтерохлороформ), δ м.д.: 21.12, 22.39, 24.14, 27.77, 28.58, 30.86, 40.15, 40.76, 46.91, 51.17, 59.93, 80.79, 155.39, 171.60, 172.85, 175.43. Найдено, %: 56,28, Н 8,32, N 10,76. $C_{18}H_{31}N_3O_6$. Вычислено, %: С 56,09, Н 8,11, N 10,91.

Гидрохлорид L-пролил-L-лейцилглицина (4).

а). К раствору 13,5 г (35 ммоль) *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцилглицина в 50 мл диоксана при интенсивном перемешивании добавляли 20 мл 6 н. раствора хлористого водорода в диоксане. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 ч, выпавший осадок отделяли от растворителя, промывали эфиром и растворяли в метаноле. Раствор фильтровали и концентрировали отгонкой растворителя при пониженном давлении до объема 30 мл. Выпавший после добавления 150 мл эфира осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Получали 8,69 г (77%) соединения (4), т. пл. $45\text{--}47^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} = -37,5^{\circ}$ ($c = 3$, H_2O). ИК-спектр, ν см^{-1} : 1744, 1683, 1651 (C=O), 1552, 1526 ($\text{NH}_{\text{амид}}$). ЯМР ^1H спектр (D_2O), δ м. д.: 0,74 д (J 6 Гц, 3H), 0,78 д (J 6 Гц, 3H), 1,44–1,60 м (3H), 1,83–1,98 м (3H), 2,27–2,38 м (1H), 3,21–3,32 м (2H), 3,78–3,90 м (2H), 4,20–4,33 м (2H). ЯМР ^{13}C спектр (D_2O), δ м. д.: 20.88, 22.03, 23.71, 24.27, 29.83, 39.69, 41.06, 46.59, 52.78, 59.80, 169.70, 172.97, 174.65. Найдено, %: С 48,41, Н 7,72, Cl 11,24, N 12,83. $C_{13}H_{24}ClN_3O_4$. Вычислено, %: С 48,52, Н 7,52, Cl 11,02, N 13,06.

б). К раствору метилата натрия, полученному из 1,38 г (60 ммоль) натрия и 100 мл метанола, добавляли 4,5 г (60 ммоль) глицина. После растворения аминокислоты к реакционной смеси

добавляли 13,49 г (30 ммоль) 4-нитрофенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцина и перемешивание продолжали в течение 24 ч. Выпавший осадок отфильтровывали и фильтрат упаривали досуха, остаток промывали эфиром и растворяли в воде. Полученный раствор фильтровали, подкисляли лимонной кислотой до pH 4, продукт экстрагировали из образовавшейся смеси этилацетатом, органические вытяжки сушили сульфатом магния, полученный раствор фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в 50 мл диоксана и к раствору при интенсивном перемешивании добавляли 20 мл 6 н. раствора хлористого водорода в диоксане. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 ч. Выделение целевого продукта проводили по описанной ранее методике. Получали 6,44 г (67%) соединения (4). ИК и ЯМР спектры соединения аналогичны описанным ранее.

L-Пролил-L-лейцилглицин (5). К раствору 6,44 г (20 ммоль) гидрохлорида L-пролил-L-лейцилглицина в 150 мл смеси метанол: хлористый метилен, взятых в соотношении 1:1, при интенсивном перемешивании по каплям добавляли раствор 2,02 г (20 ммоль) триэтиламина в 10 мл хлористого метилена. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, последовательно промывали хлористым метиленом, эфиром и сушили в вакууме. Получали 4,85 г (85%) соединения (5), т. пл. 218–221 °С, $[\alpha]_D^{20} = -43,6$ (с-2,6, H₂O). ИК-спектр, ν см⁻¹: 1677, 1653, 1614 (C=O), 1564 (NH_{амид}). ЯМР ¹H спектр (D₂O), δ м. д.: 0,71 д (J 6 Гц, 3H), 0,73 д (J 6 Гц, 3H), 1,36–1,51 м (3H), 1,81–1,95 м (3H), 2,20–2,30 м (1H), 3,16–3,30 м (2H), 3,56 с (2H), 4,16–4,27 м (2H). ЯМР ¹³C спектр (D₂O), δ м. д.: 20.70, 22.13, 23.70, 24.30, 29.75, 39.73, 43.24, 46.47, 52.82, 59.56, 169.55, 173.76, 176.05.

Список использованной литературы

1. Pan, W. From MIF-1 to endomorphin: The Tyr-MIF-1 family of peptides / W. Pan, A.J. Kastin // Peptides. – 2007. – Vol. 28, N 12. – P. 2411–2434.
2. Mishra, R. K. Pharmacology of L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (PLG) / R.K. Mishra [et al.] // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. – 1983. – Vol. 5, N 4. – P. 203–233.
3. Castensson, S. Studies on the inhibition of oxotremorine induced tremor by a melanocyte-stimulating hormone release-inhibiting factor, thyrotropin releasing hormone and related peptides / S. Castensson [et al.] // FEBS Lett. – 1974. – Vol. 44, N 1. – P. 101–105.
4. Chiu, S. Effect of L-Prolyl-L-Leucyl-Glycinamide (PLG) on Neuroleptic-Induced Catalepsy and Dopamine/Neuroleptic Receptor Bindings / S. Chiu, C. S. Paulose, R. R. Mishra // Peptides. – 1981. – Vol. 2, N 1. – P. 105–111.
5. Takashi, A. Synthesis of Calf Thymosin β_4 Fragment 16-38 and Its Effect on the Impaired Blastogenic Response of T-Lymphocytes of a Uremic Patient with Pneumonia / A. Takashi, S. Hiroshi // Chem. Pharm. Bull. – 1987. – Vol. 35, N 9. – P. 3757–3765.
6. Иванов, А. К. Синтез амида С-концевого тетрапептида последовательности окситоцина / А. К. Иванов, А. А. Антонов, И. А. Донецкий // Химия природных соединений. – 1992. – № 3, 4. – С. 393–400.
7. Юшкин, Д. В. Препаративный синтез пролиллейцилпролина / Д. В. Юшкин [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2014. – № 4. – С. 56–61.
8. Гершкович, А. А. Синтез пептидов. Реагенты и методы / А. А. Гершкович, В. К. Кибирев. – Киев: Наук. думка, 1987. – С. 172.

Поступила в редакцию 19.12.2015