

УДК 547.466

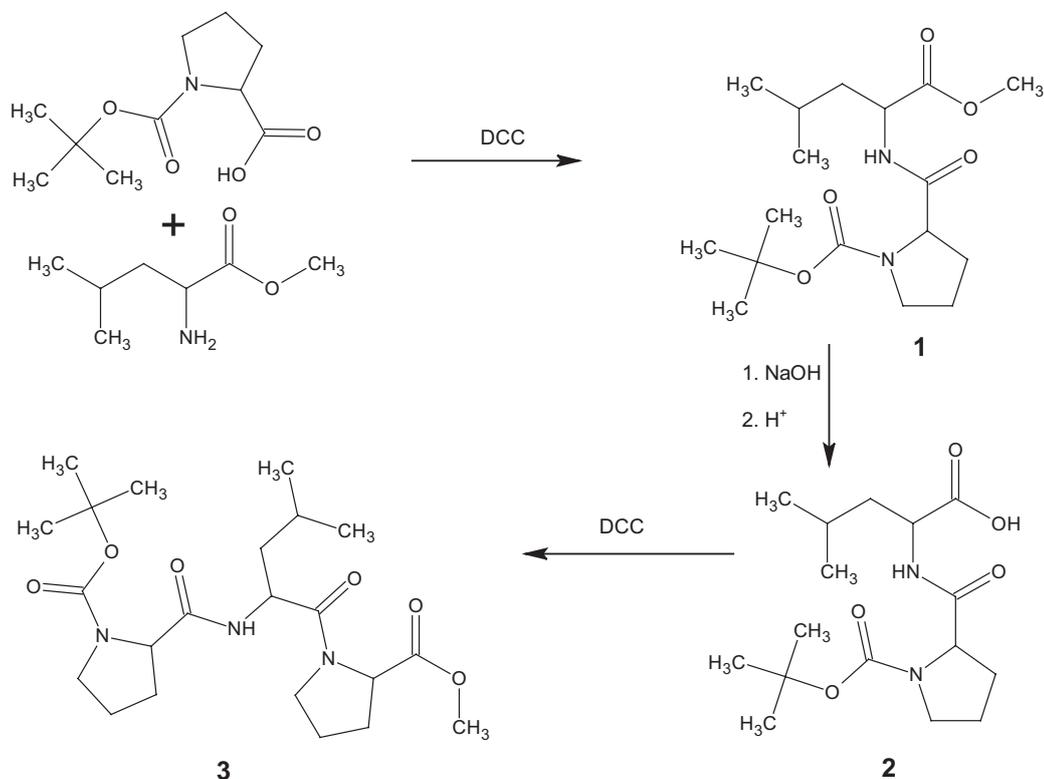
Д. В. ЮШКИН, В. А. БАРТАШЕВИЧ, З. П. ЗУБРЕЙЧУК, М. Ю. МУРАШОВА,
Л. А. ПОПОВА, В. А. КНИЖНИКОВ

ПРЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ПРОЛИЛЛЕЙЦИЛПРОЛИНА

Институт физико-органической химии НАН Беларуси

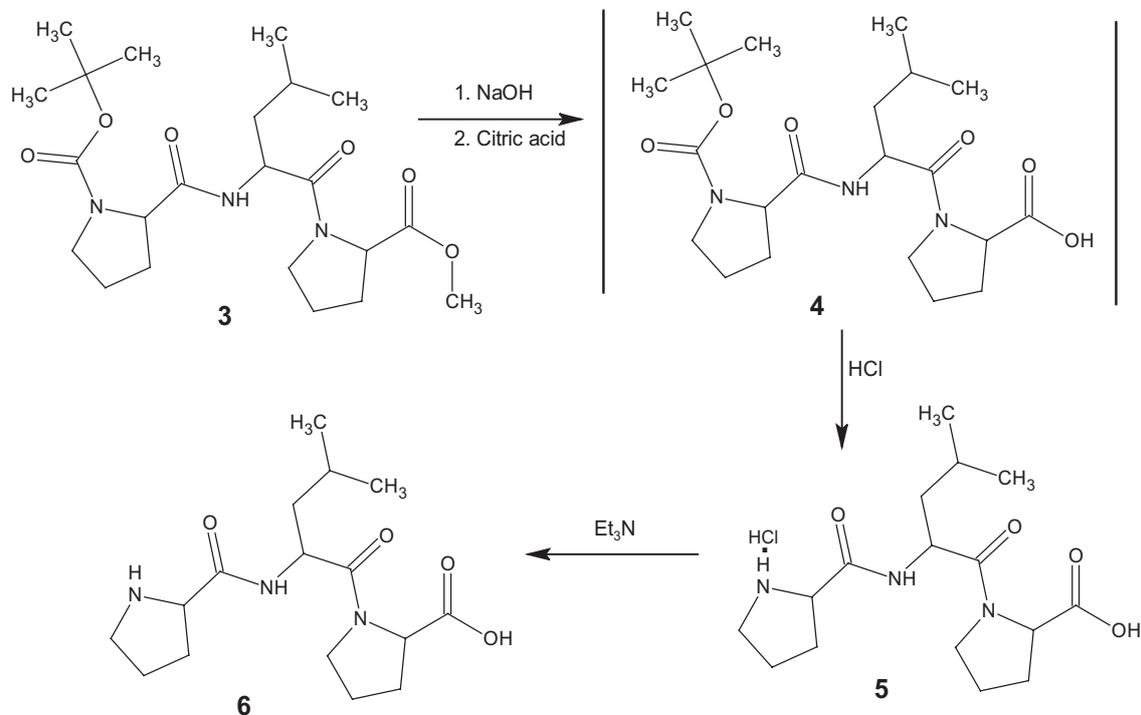
В последние годы пептиды нашли применение в качестве субстанций лекарственных средств. На основе пептидов созданы и широко применяются в лечебной практике сердечно-сосудистые и противовоспалительные препараты, анальгетики, иммуномодуляторы, кардиопротекторы. Более того, препараты пептидной природы в настоящее время являются наиболее эффективными препаратами, обладающими ноотропной, нейропротекторной, нейромодуляционной активностью. Однако количество высокоэффективных препаратов этой группы, которым располагают практики в настоящее время, неоправданно мало, что частично связано с трудностями получения значительных количеств чистых пептидов. Поэтому разработка технологичных методов синтеза пептидов является высокоактуальной задачей. Настоящая работа посвящена разработке препаративного способа синтеза L-пролил-L-лейцил-L-пролина.

В литературе описан синтез ряда производных пептидов, содержащих фрагмент Pro–Leu–Pro [1]. Для получения этих соединений авторы работы использовали трихлорэтиловые эфиры аминокислот и *tert*-бутилоксикарбонильную аминозащитную группу. В настоящей работе нами осуществлен синтез L-пролил-L-лейцил-L-пролина, основанный на использовании более доступных метиловых эфиров пролина и лейцина.

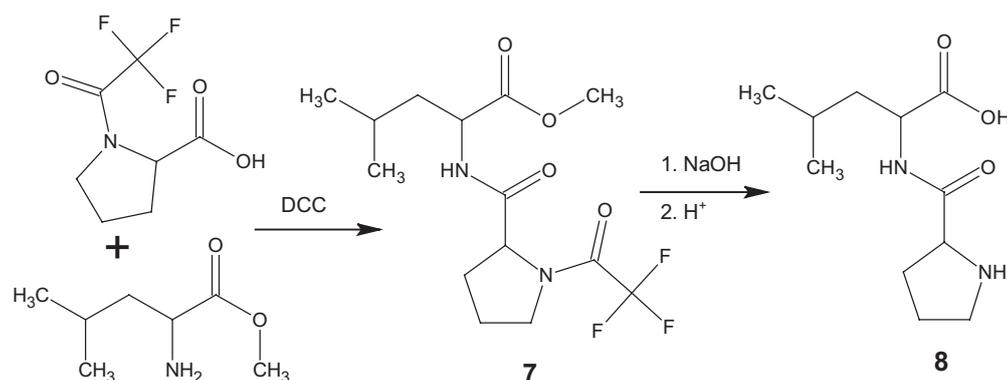


Метилловый эфир *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцил-L-пролина был получен по приведенной выше схеме с использованием в качестве конденсирующего агента дициклогексилкарбодиимида.

Последовательное удаление защитных групп в соединении **3** под действием гидроксида натрия и раствора хлористого водорода в диоксане и обработка образующегося при этом гидрохлорида L-пролил-L-лейцил-L-пролина эквимолярным количеством триэтиламина привели к целевому трипептиду.

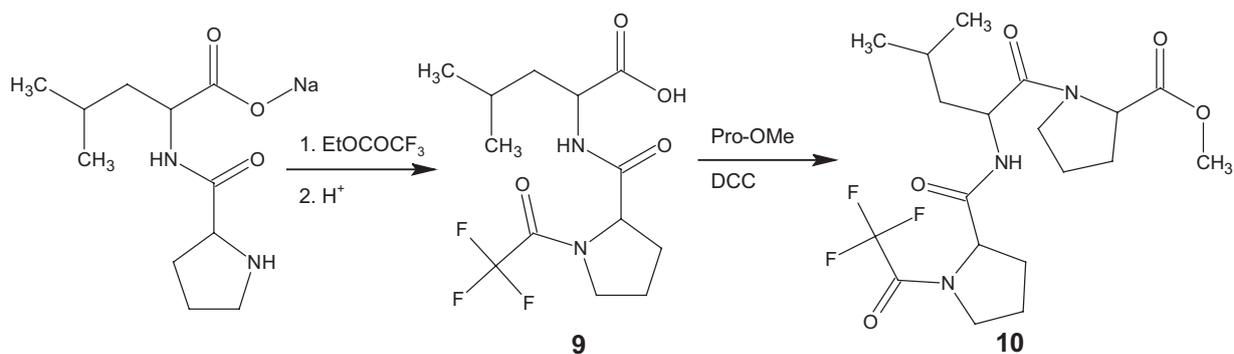


L-Пролил-L-лейцил-L-пролин получен нами и с использованием трифторацетильной аминозащитной группы. Промежуточный в синтезе целевого трипептида L-пролил-L-лейцин получен по следующей схеме.



Следует отметить, что в литературе описаны методы синтеза L-пролил-L-лейцина, в которых для защиты аминогруппы использовали тритильную [2], бензилокси- и *трет*-бутилоксикарбонильные [3] группы.

Обработка натриевой соли L-пролил-L-лейцина, полученной взаимодействием L-пролил-L-лейцина с раствором этилата натрия в этиловом спирте, этилтрифторацетатом и последующее подкисление реакционной смеси привели к N-трифторацетил-L-пролил-L-лейцину, конденсацией которого с метиловым эфиром L-пролина под действием дициклогексилкарбодиимида получен метиловый эфир N-трифторацетил-L-пролил-L-лейцил-L-пролина.



Удаление защитных групп в соединении (**10**) под действием водного раствора гидроксида натрия и последующее подкисление реакционной смеси трифторуксусной кислотой привели к L-пролил-L-лейцил-L-пролину.

Следует отметить, что физико-химические характеристики образцов трипептида (**6**), полученных как с использованием *трет*-бутилоксикарбонильной, так и трифторацетильной защитных групп, практически совпадают, что может свидетельствовать об отсутствии процессов рацемизации на всех стадиях синтеза трипептида при применении трифторацетильной аминозащитной группы.

Экспериментальная часть. Все операции проведены с использованием безводных органических растворителей. Метилловые эфиры L-лейцина и L-пролина, трифторацетил-L-пролин и *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролин получали по стандартным методикам [4]. 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.

Метилловый эфир *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцина (1). К охлажденному до 0 °С раствору 21,52 г (100 ммоль) *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролина в 150 мл тетрагидрофурана при интенсивном перемешивании последовательно добавляли растворы 20,6 г (100 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 200 мл тетрагидрофурана и 14,52 г (100 ммоль) метилового эфира L-лейцина в 100 мл тетрагидрофурана. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной и перемешивание продолжали в течение 24 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, растворитель удаляли при пониженном давлении, продукт реакции экстрагировали из остатка диэтиловым эфиром, полученный раствор фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток промывали гексаном и сушили в вакууме. Получали 29,45 г (86 %) вещества, т. пл. 78–80 °С, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -75.9$ ($c = 3$, MeOH). ИК-спектр, ν см $^{-1}$: 1740, 1700, 1656 (C=O); 1561 (NH_{амид}). ЯМР ^1H спектр (дейтерометанол), δ м. д.: 0.94 д (J 7 Гц, 3H), 0.96 д (J 7.5 Гц, 3H), 1.41 с (9H), 1.58–1.67 м (2H), 1.71–1.80 м (1H), 1.80–2.05 м (4H), 3.35–3.42 м (1H), 3.45–3.55 м (1H), 3.70 с (3H), 4.21–4.26 м (1H), 4.43–4.47 м (1H). ЯМР ^{13}C спектр, δ м. д.: 21.87, 23.51, 24.58, 26.05, 28.77, 32.55, 41.41, 48.04, 52.23, 52.77, 61.43, 81.25, 165.05, 174.20, 175.58. Найдено, %: C 59.78, H 9.02, N 7.96. C₁₇H₃₀N₂O₅. Вычислено, %: C 59.63, H 8.83, N 8.18.

***Трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцин (2).** К раствору 27,4 г (80 ммоль) метилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцина в 250 мл этанола добавляли раствор 3,2 г (80 ммоль) гидроксида натрия в 75 мл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч, фильтровали и полученный раствор подкисляли лимонной кислотой до pH 4,5. Продукт реакции экстрагировали этилацетатом, полученный раствор сушили сульфатом магния, фильтровали, растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток сушили в вакууме. Получали 21 г (80 %) вещества, т. пл. 64–76 °С, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -104$ ($c = 3$, MeOH). ИК-спектр, ν см $^{-1}$: 1753, 1703, 1666 (C=O), 1545 (NH_{амид}). ЯМР ^1H спектр (дейтерохлороформ), δ м. д.: 0.81уш.

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, 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, %: С 58.77, Н 8.85, N 8.37. $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, %: С 58.52, Н 8.59, N 8.53.

Метилловый эфир *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцил-L-пролина (3). К охлажденному до 0 °С раствору 20,1 г (60 ммоль) *трет*-бутил-оксикарбонил-L-пролил-L-лейцина в 200 мл тетрагидрофурана добавляли раствор 12,36 г (60 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 150 мл тетрагидрофурана. После перемешивания в течение 10 мин к реакционной смеси добавляли раствор 7,75 г (60 ммоль) метилового эфира пролина в 50 мл тетрагидрофурана. Температуру реакционной смеси поднимали до комнатной и перемешивание продолжали в течение 30 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, растворитель удаляли при пониженном давлении и продукт реакции экстрагировали из остатка диэтиловым эфиром. Полученный раствор фильтровали, эфир отгоняли при пониженном давлении, остаток промывали гексаном и сушили в вакууме. Получали 21,98 г (83 %) вещества, т. пл. 81–84 °С, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -138^\circ$ (с = 3, MeOH). ИК-спектр, ν см $^{-1}$: 1751, 1702, 1653 и 1636 (C=O); 1540 (NH $_{\text{амид}}$). ЯМР ^{13}C спектр, δ м. д.: 21.67, 23.08, 24.35, 24.62, 28.04, 28.73, 41.33, 41.58, 46.76, 48.78, 48.78, 51.93, 58,42, 59.71, 60.55, 80.09, 154.53, 170.45, 171. 63, 172.27. Найдено, %: С 60.38, Н 8.73, N 9.80. $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$. Вычислено, %: С 60.12, Н 8.48, N 9.56.

Гидрохлорид L-пролил-L-лейцил-L-пролина (5). К раствору 19,78 г (45 ммоль) метилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-лейцил-L-пролина в 150 мл этанола добавляли раствор 2 г (50 ммоль) гидроксида натрия в 100 мл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч, этанол отгоняли при пониженном давлении, смесь фильтровали и подкисляли лимонной кислотой до pH 4. Продукт реакции экстрагировали этилацетатом, полученный раствор сушили сульфатом магния, растворитель удаляли в вакууме и остаток растворяли в диоксане. К полученному раствору добавляли 40 мл 15%-ного раствора хлористого водорода в диоксане. Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч, выпавший осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром и сушили в вакууме. Получали 10,86 г (67 %) вещества, т. пл. 56–58 °С, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -88.3^\circ$ (с = 4.3, H $_2$ O). ИК-спектр, ν см $^{-1}$: 1741, 1680, 1632 (C=O); 1555 (NH $_{\text{амид}}$). ЯМР ^1H спектр (D $_2$ O), δ м. д.: 0.73–0.80 м (6 H), 1.38–1.45 м (2 H), 1.45–1.52 м (1 H), 1.80–1.92 м (6 H), 2.11–2.17 м (1 H), 2.22–2.30 м (1 H), 3.15–3.27 м (2 H), 3.43–3.50 м (1 H), 3.61–3.68 м (1 H), 4.16–4.25 м (2 H), 4.38–4.43 м (1 H). ЯМР ^{13}C спектр, δ м. д.: 20.53, 22.46, 23.73, 24.45, 24.70, 28.83, 29.91, 38.59, 46.63, 47.55, 50.80, 59.31, 59.59, 169.57, 172.42, 175.74. Найдено, %: С 52.88, Н 8.07, Cl 9.96, N 11.36. $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_4$. Вычислено, %: С 53.11, Н 7.80, Cl 9.80, N 11.61.

Метилловый эфир N-трифторацетил-L-пролил-L-лейцина (7). К раствору 17,67 г (83,7 ммоль) N-трифторацетил-L-пролина в 150 мл тетрагидрофурана при интенсивном перемешивании последовательно добавляли раствор 17,27 г (83,7 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 100 мл тетрагидрофурана и раствор 12,15 г (83,7 ммоль) метилового эфира L-лейцина в 100 мл тетрагидрофурана. После перемешивания в течение 24 ч смесь фильтровали и растворитель отгоняли при пониженном давлении. К полученному остатку добавляли 100 мл эфира, 150 мл гексана и смесь кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин. После охлаждения смеси осадок отфильтровывали, промывали гексаном и сушили в вакууме. Получали 24,36 г (86 %) вещества, т. пл. 97–98 °С, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -71^\circ$ (с = 3, MeOH). ИК-спектр, ν см $^{-1}$: 1742, 1697, 1670 (C=O), 1534 (NH $_{\text{амид}}$). ЯМР ^1H спектр (CDCl $_3$), δ м. д.: 0.86 д (J 6 Гц, 3H), 0.88 д (J 6 Гц, 3H), 1.53 м (1H), 1.61 м (2H), 1.99 м (2H), 2.20 м (2H), 3.71 с (3 H), 3.75 м (2H), 4.49 м (1H), 4.54 м (1H). ЯМР ^{13}C спектр, δ м. д.: 21.89, 22.76, 24.93, 25.18, 27.66, 41.22, 47.52, 51.19, 52.39, 61.26, 117 кв (CF $_3$), 156.11 кв, 169.68, 173.26. Найдено, %: С 49.89, Н 6.35, N 8.23. $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено, %: С 49.70, Н 6.26, N 8.28.

L-Пролил-L-лейцин (8). К раствору 22 г (65 ммоль) метилового эфира N-трифторацетил-L-пролил-L-лейцина в 100 мл этанола добавляли раствор 5,4 г (135 ммоль) гидроксида натрия в 50 мл воды. Реакционную смесь перемешивали 20 ч, фильтровали и к полученному раствору при интенсивном перемешивании по каплям добавляли 8 г (70 ммоль) трифторуксусной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывали, последовательно промывали водой, этанолом и диэтиловым эфиром и сушили в вакууме. Получали 11,87 г (80 %) вещества, т. пл. 249–250 °С, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -78,6^\circ$ (с = 0.18; H $_2$ O). Лит. данные: т. пл. 250–251 °С, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -80,0^\circ$ (с = 0,25, H $_2$ O) [2]. ЯМР ^1H спектр

(D₂O), δ м. д.: 0.67 д (J 6 Гц, 3H), 0.71 д (J 6 Гц, 3H), 1.35–1.48 м (3H), 1.69–1.92 м (3H), 2.18–2.31 м (1H), 3.10–3.27 м (2H), 4.17 т (J 7.5 Гц, 1 H), 4.21 т (J 6.5 Гц, 1H). ЯМР ¹³C спектр, δ м. д.: 20.62, 22.13, 23.72, 24.45, 29.79, 39.00, 46.67, 51.84, 59.56, 169.70, 175.92. Найдено, %: С 58.02, Н 8.99, N 12.08. C₁₁H₂₀N₂O₃. Вычислено, %: С 57.87, Н 8.83, N 12.27.

N-Трифторацетил-L-пролил-L-лейцин (9). К раствору этилата натрия, полученному растворением 1,15 г (50 ммоль) натрия в 200 мл этанола, при перемешивании добавляли 11,41 г (50 ммоль) L-пролил-L-лейцина. После растворения осадка к реакционной смеси добавляли 9,94 г (70 ммоль) этилтрифторацетата. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч и обрабатывали добавлением 20 мл 2,5 н. раствора хлористого водорода в этаноле. Выпавший осадок отфильтровывали, растворитель удаляли при пониженном давлении и продукт реакции экстрагировали из остатка ацетоном. Раствор фильтровали, растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток промывали гексаном и сушили в вакууме. Получали 14,10 г (87 %) вещества, т. пл. 127–129 °С, [α]²⁰_D = –67° (с = 3, MeOH). Лит. данные: т. пл. 131–133.5°С, [α]²⁰_D = –68° (с = 1, MeOH) [5]. ИК-спектр, ν см⁻¹: 1680, 1730 и 1750 (C=O), 1552 (NH_{амид}). ЯМР ¹H спектр (CDCl₃), δ м. д.: 0.85–0.95 м (6 H), 1.5–1.7 м (3 H), 1.95–2.10 м (2 H), 2.15–2.30 м (2 H), 3.65–3.80 м (2 H), 4.45–4.60 м (2 H). ЯМР ¹³C спектр, δ м. д.: 22.17, 23.36, 25.51, 25.69, 28.55, 41.09, 48.28, 51.99, 62.07, 117.34 кв, 157.35 кв, 171.17, 176. Найдено, %: С 48.36, Н 6.23, N 8.48. C₁₃H₁₉F₃N₂O₄. Вычислено, %: С 48.15, Н 5.91, N 8.64.

Метилловый эфир N-трифторацетил-L-пролил-L-лейцил-L-пролина (10). К охлажденному раствору 12,97 г (40 ммоль) N-трифторацетил-L-пролил-L-лейцина в 150 мл тетрагидрофурана последовательно добавляли раствор 8,24 г (40 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 100 мл тетрагидрофурана и 5,17 г (40 ммоль) метилового эфира пролина в 50 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч, фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток промывали гексаном и продукт реакции экстрагировали эфиром. Полученный раствор фильтровали, растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток кипятили в смеси эфир: гексан (1:5) в течение 10 мин. Выпавший при охлаждении смеси осадок отфильтровывали, промывали гексаном и сушили в вакууме. Получали 12,61 г (72 %) вещества, т. пл. 105–108 °С, [α]²⁰_D = –95.8° (с = 2, MeOH). ИК-спектр, ν см⁻¹: 1633, 1682, 1697, 1751 (C=O), 1546 (NH_{амид}). ЯМР ¹H спектр (CDCl₃), δ м. д.: 0.85–0.92 м (6 H), 1.45–1.55 м (3 H), 1.88–2.17 м (8 H), 3.65 с (3 H), 3.67–3.78 м (4 H), 4.37–4.43 м (1 H), 4.45–4.50 м (1 H), 4.66–4.73 м (1 H). ЯМР ¹³C спектр, δ м. д.: 21.83, 23.36, 24.61, 24.77, 24.99, 28.48, 29.02, 41.32, 46.94, 47.52, 49.21, 52.30, 58.94, 61.28, 118.12 кв, 156.20 кв, 170.78, 171.51, 172.41.

L-пролил-L-лейцил-L-пролин (6).

а). К раствору 9,1 г (25.14 ммоль) гидрохлорида L-пролил-L-лейцил-L-пролина в 250 мл смеси метанол: хлористый метилен (1:1) при интенсивном перемешивании по каплям добавляли 2,54 г (25,15 ммоль) триэтиламина. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали хлористым метиленом и сушили в вакууме. Получали 7,48 г (91.5 %) вещества, т. пл. 189–191 °С, [α]²⁰_D = –97.3° (с = 3, H₂O) ЯМР ¹H спектр (D₂O), δ м. д.: 0.88 д (J 6.5 Гц, 3H) и 0.94 д (J 7 Гц, 3H), 1.46–1.49 м (1H), 1.50–1.63 м (2 H), 1.95–2.10 м (6 H), 2.23–2.30 м (1 H), 2.40–2.50 м (1 H), 3.32–3.46 м (2 H), 3.62–3.70 м (1H), 3.77–3.85 м (1H), 4.12–4.15 м (1H), 4.40–4.42 м (1H), 4.57–4.59 м (1H). ЯМР ¹³C спектр, δ м. д.: 20.57, 22.64, 23.83, 24.56, 24.70, 29.34, 29.95, 38.65, 46.67, 47.60, 50.84, 59.54, 61.86, 169.53, 171.79, 178.87. Найдено, %: С 59.22, Н 8.51, N 13.07. C₁₆H₂₇N₃O₄. Вычислено, %: С 59.06, Н 8.36, N 12.91.

б). К раствору 10,88 г (25 ммоль) метилового эфира N-трифторацетил-L-пролил-L-лейцил-L-пролина в 100 мл этанола добавляли раствор 2,2 г (55 ммоль) гидроксида натрия в 30 мл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч и фильтровали. К полученному раствору при перемешивании добавляли 3,42 г (30 ммоль) трифторуксусной кислоты. После перемешивания в течение 30 мин растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток промывали ацетоном и сушили в вакууме. После переосаждения из воды ацетоном получали 6,35 г (78 %) соединения, т. пл. 188–189 °С, [α]²⁰_D = –96.7° (с = 3, H₂O).

Литература

1. *Takashi A., Hiroshi S.* // Chem. Pharm. Bull. 1987. Vol. 35, N 9. P. 3757–3765.
2. *Matsoukas J., Tsegenidis Th., Cordopatis P., Theodoropoulos D.* // Tetrahedron. 1984. Vol. 40, N 10. P. 1869–1872.
3. *Anderson G. W., Callahan F. M.* // J. Am. Chem. Soc. 1960. Vol. 82, N 13. P. 3359–3363.
4. *Гершкович А. А., Кубишев В. К.* // Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наук. думка, 1987.
5. *Tomida I., Kimura Yo., Kudo I., Kayahara H.* // Agric. Biol. Chem. 1985. Vol. 49, N 2. P. 529–531.

D. V. YUSHKIN, V. A. BARTASHEVICH, Z. P. ZUBREICHUK, M. Yu. MURASHOVA, L. A. POPOVA, V. A. KNIZHNIKOV

SYNTHESIS OF PROLYLLEUCYLPROLINE

Summary

Using trifluoroacetyl and tert-butoxycarbonyl protection for amine groups, preparative methods for synthesis of prolylleucylproline have been developed.