

**А.В. Баранов,  
Д.И. Прохоров,  
Н.П. Боярская,  
О.В. Есипова,  
Ю. Г. Кириллова**

## СИНТЕЗ НОВОГО АНАЛОГА ПЕПТИДА ProGlyPro

УДК 547.964.4

**О**существлен синтез нового аналога биологически активного пептида ProGlyPro, содержащего изостерическую псевдопептидную связь вместо амидной.

Список сокращений: Вос – трет-бутилоксикарбонил-; Vzl – бензил-; Cbz – бензилокси-карбонил-; DCM – дихлорметан; Piv – пивалоил-; STAB – триацетоксиборгидрид натрия; TEA – триэтиламин; TFA – трифторуксусная кислота.

Трипептид ProGlyPro входит в группу коротких пептидов, обладающих широким спектром физиологической активности [1]. Для изучения субстратной активности нового аналога по сравнению с немодифицированным нами было предложено заменить одну из пептидных связей на изостерическую псевдопептидную.

Синтез модифицированного трипептида ProGlyPro осуществляли согласно общей схеме (Схема 1), исходя из *L*-пролина (1) и аминокпропандиола (5). Защищенные производные (2), (3) и (4) получали из *L*-пролина (1) по стандартным методикам [2].

Аминогруппу в соединении (5) защищали с помощью Вос<sub>2</sub>O в щелочной среде. Полученный Вос-аминокпропандиол (6) окисляли периодатом калия с образованием Вос-аминоацетальдегида (7) [3]. Реакция протекала быстро и с хорошим выходом. Для образования псевдопептидной связи можно было использовать два стандартных метода: реакцию Мицунобу [4] или восстановительное аминирование [5]. В нашем случае мы выбрали второй подход в связи с меньшей токсичностью применяющихся реагентов и меньшим числом стадий. Ввиду неустойчивости соединения (7) его без дополнительной очистки сразу вводили в реакцию

восстановительного аминирования с ProOBzl (4). Реакцию проводили в DCM при комнатной температуре с использованием STAB и TEA, выход защищенного псевдодипептида (8) составил 75%.

Помимо указанного пути синтеза Вос-аминоацетальдегида нами также был опробован другой синтетический подход. Взяв за основу глицин, мы получали защищенный Вос-глицин, превращали его в амид Вейнреба (N,O-диметиламид Вос-глицина) [6] и восстанавливали при помощи литийалюмогидрида. Однако полученный данным способом Вос-аминоацетальдегид (7) не вступал далее в реакцию восстановительного аминирования с ProOBzl (4) в связи с остающимися после обработки продуктов восстановления амида соединениями алюминия.

При удалении трет-бутилоксикарбонильной группы в соединении (8) хлороводородом в диоксане, а также свежеприготовленными одно- или двухмолярными растворами хлороводорода в абсолютном метаноле наблюдалось частичное осмоление продукта. Поэтому все стадии дебокирования проводили при помощи 50% раствора TFA в DCM при 0°C, получая маслообразные трифторацетаты.

Стадии конденсации проводили по методу смешанных ангидридов с использованием изобутилхлорформиата или пивалоилхлорида. В первом случае мы получали сложноразделяемые реакционные смеси и низкие выходы целевых продуктов (порядка 20%), в то время как использование пивалоилхлорида приводило к большим выходам при меньшем числе побочных продуктов. С помощью ТСХ было показано, что активация ВосPro (2) и CbzPro (3) при действии пивалоилхлоридра протекает довольно быстро – примерно за минуту при загрузке 1 г ВосPro.

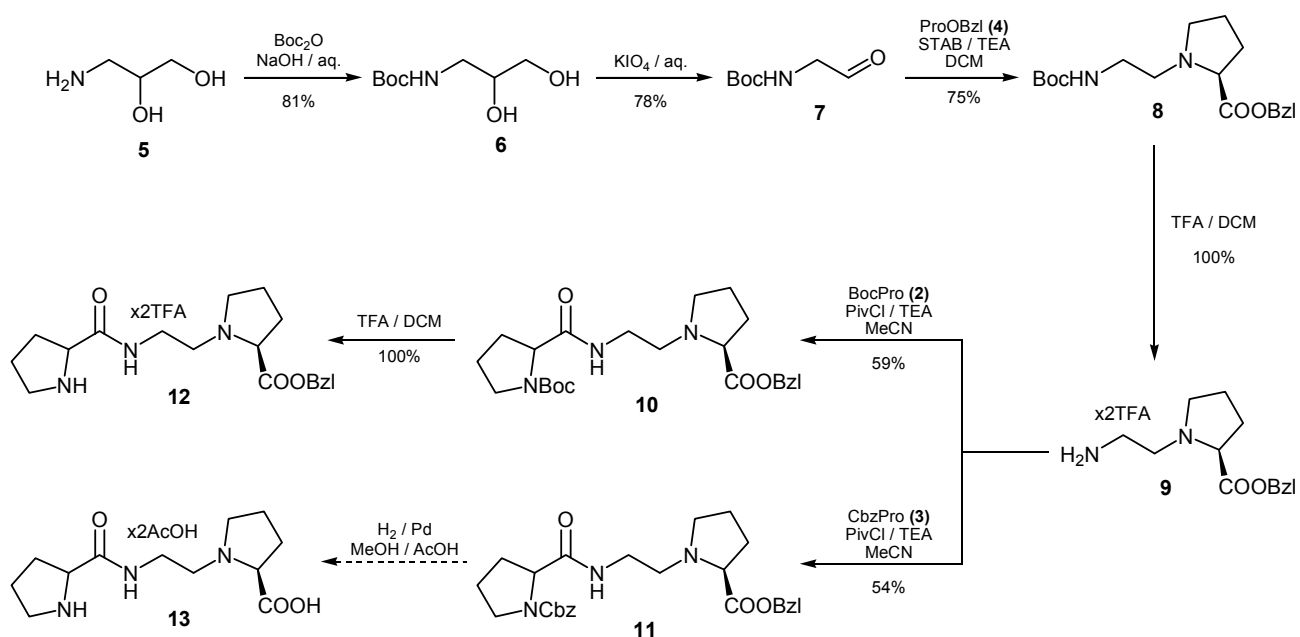


Схема 1. Схема синтеза аналога ProGlyPro.

Изменение окраски в случае соединения (2) при превышении указанного времени говорило о разрушении или модификации смешанного ангидрида защищенного пролина, что снижало выход в реакции конденсации. Уменьшение выхода на данной стадии также может быть вызвано протеканием побочной стадии циклизации нейтрализованной соли (9) с образованием циклического продукта (9a) (Схема 2). Поэтому следует избегать большого избытка третичного основания (TEA) в реакционной смеси в начальный момент времени. С другой стороны, недостаточное количество TEA приводит к неполной

конверсии активированного производного пролина и, как следствие, к более низким выходам. Поэтому мы предложили использовать шестикратный избыток третичного основания, однако, чтобы уменьшить скорость побочной реакции циклизации псевдопептида (9), TEA следует добавлять порциями, когда, согласно данным ТСХ, конверсия карбоксикомпонента приостанавливается. В процессе выделения защищенных псевдотрипептидов (10) и (11) количество водных обработок сводили к минимуму, поскольку указанные вещества достаточно хорошо растворимы в воде.

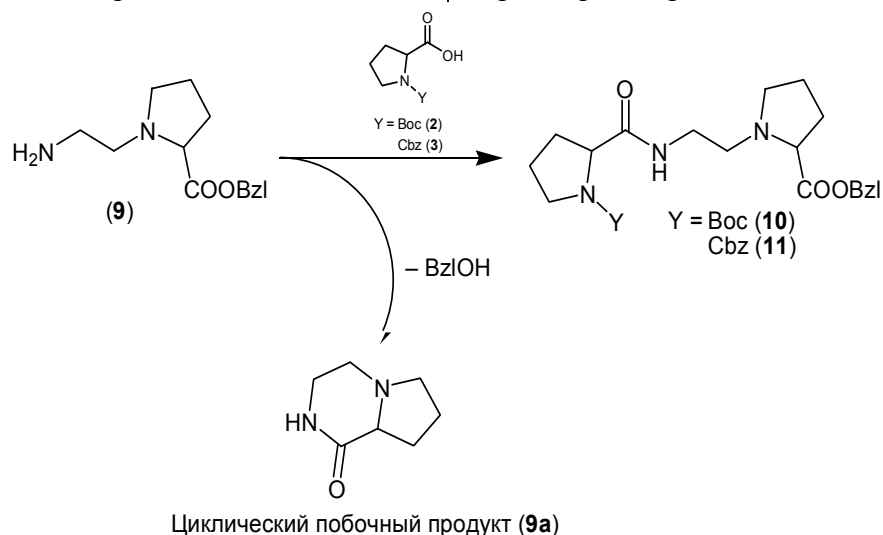


Схема 2. Образование циклического побочного продукта.

Полностью защищенные димер (8) и тримеры (10) и (11) с псевдопептидным фрагментом обладают основными свойствами из-за наличия свободной аминогруппы и третичного атома азота, поэтому для их хроматографической очистки мы использовали системы элюентов, содержащие ТЕА. Без наличия в элюирующей смеси третичного основания выделить чистый продукт из реакционной смеси нам не удалось.

Мы осуществили деблокирование соединения (10) с помощью 50% раствора TFA в DCM. По данным ТСХ реакция проходила в течение одного часа без образования побочных продуктов.

Таким образом, была отработана схема синтеза полностью защищенного псевдотрипептида – аналога ProGlyPro, а также осуществлено его пробное деблокирование.

#### Экспериментальная часть

Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР регистрировали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-300 с рабочей частотой 300 МГц.

**трет-Бутилоксикарбонил-L-пролин (2), карбобензокси-L-пролин (3) и хлоргидрат бензилового эфира L-пролина (4)** получали из L-пролина (1) стандартными методами [2].

#### Вос-аминопропандиол (6)

К охлажденному до  $0^\circ\text{C}$  раствору аминопропандиола (5) (12 мл, 156 ммоль) в 260 мл воды добавляли ди-трет-бутилпироксидкарбонат (43 мл, 187 ммоль). Смеси давали нагреться до комнатной температуры, после чего добавляли 3.67 М раствор гидроксида натрия (85 мл) до pH среды 10.5. Реакционную массу перемешивали 12 ч, после чего охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и добавляли этилацетат (250 мл). pH водной фазы доводили до 2.5 с помощью 4 М HCl. Водную фазу экстрагировали этилацетатом (3x150 мл). Объединенные органические фракции упаривали до объема 200 мл и промывали последовательно насыщенными растворами гидросульфата калия (20 мл) и хлорида натрия (20 мл). Органическую фракцию сушили сульфатом натрия, растворитель удаляли. Продукт кристаллизовали из

гексана. Выход соединения (6): 24.1 г (81%).

#### Вос-аминоацетальдегид (7)

К раствору Вос-аминопропандиола (6) (2.00 г, 10.5 ммоль) в 20 мл воды добавляли 2.41 г периодата калия (1.05 ммоль) и перемешивали 40 мин при комнатной температуре в атмосфере инертного газа. Реакционную смесь отфильтровывали, водную фазу экстрагировали хлороформом (6x25 мл), органическую фазу сушили сульфатом натрия и упаривали. Продукт сушили в вакууме масляного насоса и без дополнительной очистки вводили в следующую стадию. Выход соединения (7): 1.30 г (78%).

#### ВосGly- $\psi$ -ProOBzl (8)

К раствору хлоргидрата бензилового эфира пролина (4) (14.4 г, 67.1 ммоль) в 30 мл дихлорметана добавляли СТАВ (20.6 г, 97.3 ммоль) и затем по каплям раствор Вос-аминоацетальдегида (7) (9.6 г, 60.4 ммоль) и триэтиламина (18.7 мл, 134.3 ммоль) в 15 мл дихлорметана. Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре 2 ч. Растворитель удаляли, остаток переупаривали с метанолом, добавляли насыщенный раствор гидрокарбоната натрия и экстрагировали этилацетатом (3x200 мл). Объединенные органические фракции сушили сульфатом натрия, упаривали и хроматографировали на силикагеле в системе хлороформ – метанол – триэтиламин, 97 : 3 : 0.01. Выход соединения (8): 15.5 г (75%). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ , м. д.): 1.40 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1.64 (m, 2H, pyrrolidine- $\text{CH}_2$ ), 1.82 (m, 2H, pyrrolidine- $\text{CH}_2$ ), 2.25 (m, 2H, pyrrolidine- $\text{CH}_2$ ), 2.62 (m, 2H,  $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.06 (m, 2H,  $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.08 (m, 1H, pyrrolidine- $\text{CH}$ ), 5.25 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -Ph), 5.30 (1H, ВосHN), 7.35 (s, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

#### Трифторацетат Gly- $\psi$ -ProOBzl (9)

К раствору ВосGly- $\psi$ -ProOBzl (8) (2.01 г, 5.77 ммоль) в 11.5 мл дихлорметана, охлажденному до  $0^\circ\text{C}$ , добавляли 5.77 мл трифторуксусной кислоты и перемешивали 2 ч. Растворитель удаляли на роторном испарителе (температура в бане не должна превышать  $45^\circ\text{C}$  во избежание разложения продукта). Без дополнительной очистки продукт использовали в следующей стадии.

Выход соединения (9): 2.7 г (количественный).

#### ВосProGly-ψ-ProOBzl (10)

К раствору *трет*-бутилокси-карбонилпролина (2) (0.91 г, 4.2 ммоль) в 2 мл ацетонитрила, охлажденному до  $-5^{\circ}\text{C}$ , добавляли триэтиламин (0.65 мл, 4.6 ммоль), реакционную массу охлаждали до  $-20^{\circ}\text{C}$  и добавляли пивалоилхлорид (0.57 мл, 4.6 ммоль). Через одну минуту реакционную массу охлаждали до  $-30^{\circ}\text{C}$  и прибавляли предварительно охлажденный раствор аминокомпонента. Раствор аминокомпонента готовили следующим образом: соединение (9) (2.62 г, 5.5 ммоль) растворяли в 3.5 мл ацетонитрила, добавляли триэтиламин (1.76 мл, 12.6 ммоль), охлаждали до  $-10^{\circ}\text{C}$  и через указанное время прибавляли к раствору карбоксикомпонента. По мере расходования активированного производного защищенного пролина порциями добавляли еще 4 мл триэтиламина и оставляли реакционную массу перемешиваться 12 ч. Растворитель удаляли, остаток растворяли в 15 мл этилацетата, промывали водой (2 мл), 10% раствором гидросульфата калия (2 мл), насыщенным раствором хлорида натрия (2 мл). Органическую фазу сушили сульфатом натрия, растворитель удаляли. Продукт хроматографировали на силикагеле в системе этилацетат – триэтиламин, 100 : 0.1. После отгонки органических растворителей остаток сушили в вакууме масляного насоса. Выход соединения (10): 1.1 г (59%). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ , м. д.): 1.40 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1.64 (m, 4H, pyrrolidine<sub>1,2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.82 (m, 2H, pyrrolidine<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.90 (m, 2H, pyrrolidine<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.25 (m, 2H, pyrrolidine<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.62 (m, 2H,

C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.30 (m, 2H, C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.08 (m, 1H, pyrrolidine<sub>2</sub>-CH), 3.35 (m, 2H, pyrrolidine<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.29 (m, 1H, pyrrolidine<sub>1</sub>-CH), 5.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 5.30 (1H, BocHN), 7.35 (s, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

#### CbzProGly-ψ-ProOBzl (11)

Реакцию проводили аналогично получению соединения (10), исходя из 1.05 г (4.2 ммоль) карбобензоксипролина (3). Выход соединения (11): 0.95 г (47%). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , м. д.): 1.64 (m, 4H, pyrrolidine<sub>1,2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.82 (m, 2H, pyrrolidine<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.90 (m, 2H, pyrrolidine<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.25 (m, 2H, pyrrolidine<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.62 (m, 2H, C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.30 (m, 2H, C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.08 (m, 1H, pyrrolidine<sub>2</sub>-CH), 3.35 (m, 2H, pyrrolidine<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.29 (m, 1H, pyrrolidine<sub>1</sub>-CH), 5.25 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>-Ph), 5.30 (1H, BocHN), 7.35 (s, 10H, 2C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

#### Трифторацетат ProGly-ψ-ProOBzl (12)

ВосProGly-ψ-ProOBzl (10) (50 мг, 0.112 ммоль) растворяли в 0.22 мл дихлорметана, охлаждали до  $0^{\circ}\text{C}$  и добавляли трифторуксусную кислоту (0.11 мл). Через 1 ч растворитель удаляли на роторном испарителе (температура в бане не должна превышать  $40^{\circ}\text{C}$  во избежание разложения продукта) и сушили в вакууме масляного насоса. Продукт получали в виде масла. Выход соединения (12): 64 мг (количественный). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ , м. д.): 2.10 (m, 4H, pyrrolidine<sub>1,2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.30 (m, 2H, pyrrolidine<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.40 (m, 2H, pyrrolidine<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.35 (m, 2H, pyrrolidine<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.40 (m, 2H, pyrrolidine<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.50 (m, 2H, C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.70 (m, 2H, C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.80 (m, 1H, pyrrolidine<sub>2</sub>-CH), 4.40 (m, 1H, pyrrolidine<sub>1</sub>-CH), 5.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 7.35 (s, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.80 (m, 3H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>, NH<sup>+</sup>), 9.05 (s, 1H, C(O)NH).

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П. Нейрохимия. – М.: Изд-во Ин-та биомедицинской химии РАМН, 1996. – 269 с.
2. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. – Киев: Наукова думка, 1992. – 360 с.
3. Kim L. Dueholm, Michael Egholm, Ole Buchardt. //Organic preparations and procedures. – 1993. – V. 25, №4. – P. 457–461.
4. Mitsunobu O. //Synthesis. – 1981. – V. 13, №1. – P. 1–28.
5. Ahmed F. Abdel-Magid, Kenneth G. Carson, Bruce D. Harris, Cynthia A. Maryanoff, Rekha D. Shah. //J. org. chem. – 1996. – V. 61, №11. – P. 3849–3862.
6. Larisa Kosynkina, Wei Wang, T. Chyan Liang. //Tetrahedron lett. – 1994. – V. 35, №29. – P. 5173–5176.