

© Коллектив авторов, 2004

Ю. П. Швачкин, С. М. Фунтова, А. П. Смирнова,  
Т. Н. Храброва, В. В. Князева

## СИНТЕЗ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ УЧАСТКА 16 – 19 СОМАТОЛИБЕРИНА

Институт экспериментальной эндокринологии Эндокринологического  
научного центра РАМН, Москва

В связи с изучением пептидных стимуляторов секреции инсулина мы разработали метод синтеза и осуществили получение неизвестных ранее структурных аналогов участка 16 – 19 соматолиберина [1, 2].

Предварительно для решения этой задачи были изучены три подхода.

Первый подход был основан на использовании в качестве конденсирующего агента карбонилдидиимидазола.

Второй подход предусматривал образование пептидных связей с применением производных 1,2-дигидрохинолина. Были, в частности, изучены варианты пептидного синтеза с использованием N-этилоксикарбонил-2-этилокси-1,2-дигидрохинолина (ЭЭДХ) и N-изобутилоксикарбонил-2-изобутилокси-1,2-дигидрохинолина (ИИДХ).

Третий подход базировался на применении активированных эфиров N-защищенных аминокислот.

После экспериментальной оценки различных вариантов синтеза мы пришли к заключению, что наиболее предпочтительным является третий подход, поскольку он обеспечивает получение целевых пептидов с высокими выходами, исключает нежелательные побочные реакции, позволяет контролировать процессы рацемизации и менее трудоемок.

В результате проведенных исследований разработан эффективный метод синтеза неизвестных ранее структурных аналогов участка 16 – 19, являющегося частью аминоконцевой области соматолиберина.

Характерными особенностями этого метода синтеза являются:

- 1) применение в качестве аминоконцептов бензиловых эфиров аминокислот и пептидов;
- 2) применение в качестве карбоксильных компонентов пентафторфениловых эфиров N-защищенных аминокислот;
- 3) использование для маскирования  $\alpha$ -аминогрупп в карбоксильных компонентах кислотолабильной трет-бутилоксикарбонильной защиты;
- 4) применение в случае  $\omega$ -амидов дикарбоновых аминокислот их *n*-нитрофениловых эфиров;
- 5) использование стратегии ступенчатого построения пептидных цепей в направлении C  $\rightarrow$  N.

Важным преимуществом разработанного метода синтеза является возможность применения защищенных производных трифункциональных аминокислот для получения гидрофобных аналогов соматолиберина.

Мы также установили, что выделение целевых соединений из реакционных смесей существенно облегчается, если проводить стадии конденсации в среде диметилформамида. При этом целевые пептиды могут быть выделены в кристаллическом состоянии и очищены перекристаллизацией.

Следует указать, что при использовании этого метода синтеза строение всех новых пептидов однозначно определяется схемой синтеза, и синтетические аналоги аминоконцевой области соматолиберина могут быть получены в аналитически чистом виде.

На основе использования разработанного метода синтеза нами получены неизвестные ранее пептиды (I – VI), представляющие собой структурные аналоги последовательности 16 – 19 аминоконцевой области соматолиберина.

Исходными соединениями в этих синтезах служили тозилат бензилового эфира L-аланина (VII), N-трет-бутилоксикарбонил-O-бензил-L-серин (VIII), пентафторфениловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил-L-лейцина (IX) и *n*-нитрофениловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил-L-глутамина (X).

Конкретные методики синтеза неизвестных ранее пептидов (I – VI) приведены в экспериментальной части.

Осуществление синтеза структурных аналогов участка 16 – 19 соматолиберина обеспечивает необходимые предпосылки для изучения биологической активности этих соединений и, в частности, для оценки их влияния на процессы секреции инсулина.

### Экспериментальная часть

Температуру плавления соединений определяли на приборе типа Voetius-Analytik.

Измерения оптической активности выполняли на поляриметре типа MA-511-0 фирмы Hilger Watts.

Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) применяли пластинки Silufol UV-254 [3]. Использовали следующие системы растворителей: 1-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:1) (система 1); этилацетат – петролейный эфир (1:1) (система 2); хлороформ – метанол (9:1) (система 3); 1-бутанол – пиридин – уксусная кислота – вода (15:10:3:12) (система 4). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидрина или обработкой хроматограмм параамино йода.

Для аминокислотного анализа пептиды подвергали кислотному гидролизу в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 110 °С, 20 ч). Содержание аминокислот в гидролизатах определяли с помощью автоматического аминокислотного анализатора типа TSM фирмы Technicon.

Данные элементных анализов полученных соединений соответствуют брутто-формулам.

#### **Бензиловый эфир *N*-трет-бутилоксикарбонил-О-бензил-L-серил-L-аланина (I).**

К охлажденному до  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  раствору 3,09 г (10 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонил-О-бензил-L-серина (VIII) в 25 мл тетрагидрофурана (ТГФ) прибавляют при перемешивании 1,1 мл (10 ммоль) *N*-метилморфолина и затем 1,3 мл (10 ммоль) *n*-бутилхлоркарбоната. Реакционную смесь перемешивают 15 мин при  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , затем прибавляют раствор 3,5 г (10 ммоль) тозилата бензинового эфира L-аланина (VII) и 1,1 мл (10 ммоль) *N*-метилморфолина в 12 мл диметилформамида (ДМФА). Полученную смесь выдерживают 1 ч при  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  и 18 ч при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Выпавший осадок отделяют фильтрованием, фильтрат упаривают в вакууме, остаток растворяют в 250 мл этилацетата, полученный раствор последовательно промывают 5 % водным раствором бисульфата калия, водой, 5 % водным раствором бикарбоната калия и снова водой. Сушат этилацетатный раствор безводным сульфатом натрия, упаривают в вакууме. Маслообразный остаток растирают с диэтиловым эфиром. Образовавшиеся кристаллы отделяют фильтрованием, промывают эфиром и высушивают в вакуум-эксикаторе над фосфорным ангидридом. Получают 4,55 г (90 %) дипептида (I) с т.пл.  $36-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} - 17,5^{\circ}$  (с 1,0; MeOH). ТСХ:  $R_f$  0,90 (система 1); 0,65 (система 2).  $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_6$ . Аминокислотный анализ: Ser 0,97; Ala 1,00.

#### **Бензиловый эфир О-бензил-L-серил-L-аланина (II).**

К 12 мл 10 % раствора хлористого водорода в диоксане прибавляют 3,22 г (7 ммоль) соединения (I), смесь выдерживают 45 мин при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , затем растворитель удаляют в вакууме, остаток обрабатывают эфиром. Образовавшиеся кристаллы отделяют, промывают эфиром и высушивают в вакууме над фосфорным ангидридом. Получают 2,82 г (99,8 %) дипептида (II) в форме монохлоргидрата с т.пл.  $44-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cl}$ . Аминокислотный анализ: Ser 0,89; Ala 1,00.

#### **Бензиловый эфир *N*-трет-бутилоксикарбонил-L-лейцил-О-бензил-L-серил-L-аланина (III).**

К раствору 2,80 г (7 ммоль) соединения (II) в 8 мл ДМФА при  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  и перемешивании прибавляют 1 мл (7 ммоль) триэтиламина и затем 3 г (7,7 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*-трет-бутилоксикарбонил-L-лейцина (IX). Реакционную смесь выдерживают 2 ч при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , выпавший осадок отделяют фильтрованием, фильтрат упаривают в вакууме, остаток растворяют в 10 мл смеси этилацетат – петролейный эфир (1:1) и полученный раствор вводят в хроматографическую колонку ( $3 \times 30\text{ см}$ ) с силикагелем (Silicagel-L, 40/10, Chemapol), уравновешенную смесью этилацетат – петролейный эфир (1:1). Колонку промывают указанной смесью растворителей, отбирая элюат порциями по 10 мл. Контроль за ходом хроматографии осуществляют посредством ТСХ. Фракции, содержа-

щие хроматографически индивидуальное вещество, объединяют, растворители удаляют в вакууме, остаток высушивают в вакуум-эксикаторе над фосфорным ангидридом. Получают 3,6 г (90 %) трипептида (III) с т.пл.  $98-99\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} - 33,7^{\circ}$  (с 1,0; MeOH). ТСХ:  $R_f$  0,88 (система 1); 0,45 (система 2).  $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_7$ . Аминокислотный анализ: Leu 1,00; Ser 0,87; Ala 1,03.

#### **Бензиловый эфир L-лейцил-О-бензил-L-серил-L-аланина (IV).**

К 13 мл 10 % раствора хлористого водорода в диоксане прибавляют 3,3 г (5,8 ммоль) соединения (III), смесь выдерживают 45 мин при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , после чего растворитель отгоняют в вакууме, остаток растирают с эфиром, полученные кристаллы отделяют фильтрованием, промывают эфиром и высушивают в вакуум-эксикаторе над фосфорным ангидридом. Получают 2,76 г (94 %) трипептида (IV) в форме монохлоргидрата с т.пл.  $88-89\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_5\text{Cl}$ . Аминокислотный анализ: Leu 1,00; Ser 0,92; Ala 1,03.

#### **Бензиловый эфир *N*-трет-бутилоксикарбонил-L-глутаминил-L-лейцил-О-бензил-L-серил-L-аланина (V).**

К раствору 2,75 г (5 ммоль) соединения (IV) в 9 мл ДМФА прибавляют при  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  и перемешивании 2,02 г (5,5 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира *N*-трет-бутилоксикарбонил-L-глутамина (X) и 0,55 мл (5 ммоль) *N*-метилморфолина. Реакционную смесь выдерживают 1 ч при  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  и 24 ч при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Выпавшее в осадок вещество отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме, остаток растирают с этилацетатом. Образовавшиеся кристаллы отделяют фильтрованием, промывают на фильтре 5 % водным раствором бикарбоната калия, водой, 1 н. раствором гидроокиси аммония, диэтиловым эфиром и перекристаллизовывают из этанола. Получают после высушивания в вакууме 3,13 г (89,7 %) тетрапептида (V) с т.пл.  $201-202\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} - 25,9^{\circ}$  (с 1,0; ДМФА). ТСХ:  $R_f$  0,92 (система 1); 0,80 (система 3); 0,82 (система 4).  $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_9$ . Аминокислотный анализ: Glu 1,07; Leu 1,00; Ser 0,85; Ala 1,01.

#### **Бензиловый эфир L-глутаминил-L-лейцил-О-бензил-L-серил-L-аланина (VI).**

К 5 мл 10 % раствора хлористого водорода в диоксане прибавляют 1,1 г (1,6 ммоль) соединения (V). Реакционную смесь выдерживают 45 мин при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , диоксан удаляют упариванием в вакууме, остаток обрабатывают эфиром. Полученные кристаллы отделяют и высушивают в вакууме. Получают 1 г (99,8 %) тетрапептида (VI) в форме монохлоргидрата с т.пл.  $101-102\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_7\text{Cl}$ . Аминокислотный анализ: Glu 1,03; Leu 1,00; Ser 0,87; Ala 1,02.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 03-03-32100).

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. N. Ling, F. Esch, P. Bohlen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**(14), 4302 – 4306 (1984).
2. G. Sassolas, *Horm. Res.*, **53**, Suppl. 3, 88 – 92 (2000).
3. T. Csernati, E. Forgacs, *Anal. Chim. Acta*, **316**(1), 105 – 110 (1995).

Поступила 28.06.04.