

Методы синтеза и технология производства лекарственных средств

© Коллектив авторов, 2002

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

СИНТЕЗ НОВОГО СТРУКТУРНОГО АНАЛОГА ТИРОТРОПИН-РИЛИЗИНГ-ГОРМОНА

Институт экспериментальной эндокринологии Эндокринологического
научного центра РАМН, Москва

В связи с изучением пептидных биорегуляторов секреции пролактина нами осуществлен синтез неизвестного ранее пироглутамилпептида (I), представляющего собой структурный аналог гипоталамического тиротропин-рилизинг-гормона (ТРГ) [1, 2], отличающегося от природного гормона односточечной заменой остатка *L*-гистидина в положении 2 ТРГ на остаток протеиногенной гидроксиаминокислоты *L*-серина.



После сравнительного анализа и экспериментальной оценки различных вариантов синтеза трипептида (I) было установлено, что перспективным способом получения этого соединения может быть ступенчатый синтез в растворе по схеме, предусматривающей наращивание пептидной цепи в направлении от аминоконцевого аминокислотного остатка к карбоксильному концу пептида.

На основе этого подхода был разработан эффективный метод полного химического синтеза *L*-пироглутамил-*L*-серил-*L*-пролинамида (I).

Особенностью этого метода синтеза является возможность введения амида *L*-пролина на заключительном этапе процесса пептидного синтеза.

Исходными соединениями в рассматриваемом синтезе служили *N*-бензилоксикарбонил-*L*-пироглутаминовая кислота (II), хлоргидрат метилового эфира *O*-бензил-*L*-серина (III) и *L*-пролинамид (IV). Промежуточными соединениями являлись метиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*L*-пироглутамил-*O*-бензил-*L*-серина (V), метиловый эфир *L*-пироглутамил-*L*-серина (VI) и гидразид *L*-пироглутамил-*L*-серина (VII).

Для образования пептидных связей на стадиях конденсации последовательно применяли карбодимидный и азидный методы.

Строение всех промежуточных соединений и целевого трипептида (I) однозначно определяется указанной схемой синтеза.

Новый структурный аналог ТРГ получен в аналитически чистом виде. Степень его чистоты подтверждена результатами элементных и аминокислотных анализов.

Осуществление синтеза *L*-пироглутамил-*L*-серил-*L*-пролинамида (I) обеспечивает необходимые предпо-

сылки для изучения биологической активности этого соединения и его влияния на процессы секреции пролактина и других гипофизарных гормонов.

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: бензол — метанол (9:1) (система 1); бензол — метанол (48:1) (система 2); 1-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:1) (система 3); хлороформ — метанол — 25 % аммиак (12:9:4) (система 4); 2-бутанол — муравьиная кислота — вода (75:13:11) (система 5); 1-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (15:10:3:12) (система 6). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидрина или обработкой хроматограмм параами 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 Testicon.

Данные элементных анализов полученных соединений соответствуют теоретически вычисленным для указанных брутто-формул.

Метиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*L*-пироглутамил-*O*-бензил-*L*-серина (V). Прибавляют к суспензии 2,7 г (11 ммоль) хлоргидрата метилового эфира *O*-бензил-*L*-серина (III) в 8 мл ацетонитрила при – 10 °С 1,6 мл (11 ммоль) триэтиламина и охлажденный раствор 2,9 г (11 ммоль) *N*-бензилоксикарбонил-*L*-пироглутаминовой кислоты (II) в 15 мл ацетонитрила. После перемешивания в течение 20 мин при – 10 °С прибавляют 2,26 г (11 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Реакционную смесь перемешивают 1 ч при – 10 °С и выдерживают 12 ч при 0 °С. Выпавшую в осадок дициклогексилмочевину отделяют фильтрованием, промывают ацетонитрилом, объединенные фильтраты упаривают в вакууме, остаток растворяют в хлористом метиле, промывают 1 % водным раствором лимонной кислоты, 10 % водным раствором кар-

боната натрия и насыщенным при 20 °С водным раствором хлорида натрия. Раствор высушивают над сульфатом натрия, упаривают в вакууме и полученный остаток перекристаллизовывают из метанола. Получают 3,7 г (74 %) соединения V с т. пл. 112 – 114 °С. ТСХ: R_f 0,50 (система 1); 0,25 (система 2). $[\alpha]_D^{20} - 36^\circ$ (с 1,0; MeOH). $C_{24}H_{26}N_2O_7$.

Метилловый эфир L-пироглутамил-L-серина (VI).

Растворяют 2,5 г соединения V в смеси 110 мл метанола и 10 мл уксусной кислоты. Полученный раствор гидрируют 48 ч при 20 °С в присутствии палладиевой черни. Затем катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме и остаток перекристаллизовывают из метанола. Получают 1,06 г (92 %) соединения VI с т.пл. 178 – 180 °С. ТСХ: R_f 0,10 (система 1); 0,30 (система 3). $[\alpha]_D^{20} - 21^\circ$ (с 1,0; MeOH). $C_9H_{14}N_2O_5$.

Гидразид L-пироглутамил-L-серина (VII).

К суспензии 1,66 г (7,2 ммоль) соединения (VI) в 25 мл метанола прибавляют при 0 °С по каплям 1,85 мл (37 ммоль) гидразингидрата. Реакционную смесь выдерживают 15 ч при 4 °С и еще 48 ч при 20 °С. Выпавшее в осадок вещество отделяют фильтрованием, промывают метанолом и перекристаллизовывают из смеси метанол — вода (4:1). Получают 1,46 г (88 %) соединения (VII) с т.пл. 213 – 214 °С (разл.). ТСХ: R_f 0,25 (система 1); 0,56 (система 4); 0,27 (система 6). $[\alpha]_D^{20} - 40^\circ$ (с 1,0; H₂O). $C_8H_{14}N_4O_4$.

L-Пироглутамил-L-серин-L-пролинамид (I).

К раствору 0,69 г (3 ммоль) соединения (VII) в 30 мл смеси диметилформаида с диметилсульфоксидом (1:1) прибавляют при 0 °С 3 мл 10 н. раствора хлористого водорода в тетрагидрофуране, охлаждают полученный раствор до –20 °С и прибавляют по каплям при перемешивании 0,58 мл (4,3 ммоль) амилнитрита. Смесь перемешивают 30 мин, охлаждают до –25 °С и прибавляют смесь 0,42 мл (3 ммоль) триэтиламина и раствора 0,34 г (3 ммоль) L-пролинамида (IV) в 3 мл диметилформаида. Полученную реакционную смесь перемешивают 30 мин при –20 °С и затем выдерживают 18 ч при 4 °С. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают диметилформаидом, объединенные фильтраты упаривают в вакууме, остаток очищают переосаждением из метанола диэтиловым эфиром. Получают 0,36 г (52 %) соединения I с $[\alpha]_D^{20} - 83^\circ$ (с 1,0; 50 % CH₃CO₂H). ТСХ: R_f 0,35 (система 3); 0,38 (система 5); 0,65 (система 6). $C_{13}H_{20}N_4O_5$. Аминокислотный анализ: Glu 1,00; Ser 0,90; Pro 0,87.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 00–03–32829а).

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Burgus and R. Guillemin, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 499 – 526 (1970).
2. R. M. G. Nair, J. F. Barrett, C. Y. Bowers, et al., *Biochemistry*, **9**(5), 1103 – 1106 (1970).
3. T. Csernati and E. Forgacs, *Anal. Chim. Acta*, **316**(1), 105 – 110 (1995).

Поступила 10.09.02