

Разработка оптимальной схемы синтеза дипептидного лиганда TSPO, амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (ГД-102), потенциального анксиолитика

© Деева О. А.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация. Ранее в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был сконструирован и синтезирован дипептидный лиганд TSPO, соединение амид N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (лабораторный шифр ГД-102), для которого выявлена анксиолитическая активность в дозах 0,01–1,0 мг/кг внутривенно (в/в) у мышей. Дипептид ГД-102 также обладал антидепрессивной активностью в дозах 0,01 и 0,05 мг/кг в/в у мышей BALB/c в тесте вынужденного плавания по Порсолту. Лигандные свойства дипептида ГД-102 к TSPO были подтверждены методом фармакологического ингибиторного анализа и методом молекулярного докинга. Данная работа посвящена разработке оптимальной схемы синтеза дипептида ГД-102. Опробованы 3 метода: 1 метод — активированных сукцинимидных эфиров, 2 метод — активированных пентафторфениловых эфиров и 3 — имидазолидный метод. Проведено сравнение этих трёх схем синтеза по выходу и оптической чистоте конечного продукта. Показано, что оптимальной схемой синтеза является первая — с использованием сукцинимидных эфиров.

Ключевые слова: дипептид; ГД-102; лиганд TSPO; пептидный синтез

Для цитирования:

Деева О. А. Разработка оптимальной схемы синтеза дипептидного лиганда TSPO, амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (ГД-102), потенциального анксиолитика. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(4):83–94. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-83-94>

Поступила: 24.07.2023. **В доработанном виде:** 28.08.2023. **Принята к печати:** 07.09.2023. **Опубликована:** 30.12.2023

Development of the optimal scheme for the synthesis of the dipeptide TSPO ligand, N-phenylpropionyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide (GD-102), a potential anxiolytic drug

© Olga A. Deeva

Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract. Previously at the Zakusov Research Institute of Pharmacology the first dipeptide ligand TSPO, the compound N-phenylpropionyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide (laboratory code GD-102), was designed and synthesized. The anxiolytic activity was detected for this compound at the doses 0.01–1.0 mg/kg intraperitoneally (ip) in mice. Dipeptide GD-102 also possessed antidepressant-like activity at the doses 0.01 and 0.05 mg/kg ip in BALB/c mice in the Porsolt forced swim test. The ligand properties of dipeptide GD-102 to TSPO were confirmed by pharmacological inhibitory analysis and molecular docking. This work is devoted to the development of the optimal scheme for the synthesis of the GD-102. 3 methods were tried — 1 activated succinimide esters method, 2 activated pentafluorophenyl ethers method and 3 imidazolidine method. These three synthesis schemes have been compared in terms of yield and optical purity of the final product. It was shown that the optimal synthesis scheme is the first one, using succinimide esters.

Keywords: dipeptide; GD-102; TSPO ligand; peptide synthesis

For citations:

Deeva OA. Development of the optimal scheme for the synthesis of the dipeptide TSPO ligand, N-phenylpropionyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide (GD-102), a potential anxiolytic drug. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(4):83–94. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-4-83-94>

Received: 24.07.2023. **Revision received:** 28.08.2023. **Accepted:** 07.09.2023. **Published:** 30.12.2023.

Введение / Introduction

Дипептидные лиганды TSPO были получены нами впервые в мире [1, 2]. Конструирование проводилось с использованием оригинальной стратегии создания дипептидных лекарств “drug-based peptide design” (DBPD) [3, 4]. В качестве непептидного прототипа был использован алпидем, классический лиганд TSPO, представитель имидазо[1,2-а]пиридиновой группы [5]. Алпидем содержит в себе два ароматических ядра, фенильное и бициклическое азотсодержащее и разветвленную алифатическую цепь, которые могут имитировать боковые радикалы фенилаланина, триптофана и изолейцина или лейцина, соответственно. Кроме того, в структуру алпидема входит амидная группа, возможный прототип пептидной связи. На основании этих структурных особенностей алпидема

нами был сконструирован амид N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, получивший лабораторный шифр ГД-102 (см. рис. 1) [2, 6].

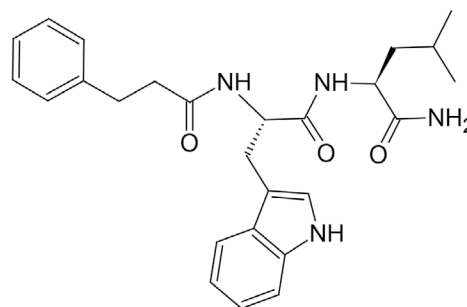


Рис. 1. Структура дипептидного лиганда TSPO ГД-102
Fig. 1. Structure of the dipeptide TSPO ligand GD-102

ГД-102 обладал анксиолитической активностью у мышей BALB/c при однократном внутривенном (в/в) введении в тесте открытого поля со световой вспышкой (ОП) в дозах 0,01–1,0 мг/кг, а также в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) в дозах 0,1–1,0 у мышей ICR. Было показано, что ГД-102 обладал антидепрессивной активностью в дозах 0,01 и 0,05 мг/кг в/в у мышей BALB/c в тесте вынужденного плавания по Порсолту. Лигандные свойства дипептида ГД-102 к TSPO были подтверждены методом фармакологического ингибиторного анализа с использованием селективного блокатора TSPO — соединения PK11195 [6] и методом молекулярного докинга в программе Glide Schrodinger [2]. Таким образом, дипептид ГД-102 можно рассматривать как потенциальный препарат для комплексного лечения тревожного и депрессивного расстройств.

Для разработки фармакологически активного соединения в качестве потенциального лекарственного средства необходимо выбрать оптимальный метод синтеза, который ляжет в основу лабораторного регламента. В данной работе опробованы три различные схемы синтеза дипептида ГД-102.

Для получения ГД-102 предпочтительно использование классических методов пептидного синтеза в растворе. Обычно процесс получения дипептидов состоит в конденсации требуемых аминокислот, как правило, в гомогенной фазе. При этом чаще всего используется аминокислота, имеющая активированную карбоксильную группу и защищенные другие реакционноспособные группы, и вторая аминокислота, которая имеет свободную аминогруппу и защищенные другие реакционноспособные группы. Из методов активации карбоксильной группы, применяемых в пептидном синтезе, наиболее популярны реагенты, образующие активированные эфиры в присутствии водоотнимающих агентов, а также имидазолиды аминокислот [7]. Метод активированных эфиров даёт меньше побочных продуктов по сравнению, например, с методом смешанных ангидридов. Из активированных эфиров чаще всего применяются *N*-оксисукцинимидные эфиры [8]. Это связано с тем, что выделяющийся в процессе конденсации *N*-гидроксисукцинимид легко переходит в водную фазу, что облегчает очистку продукта реакции. В некоторых случаях используют пентафторфениловые эфиры [9], достоинством которых является большая скорость реакции по сравнению с *N*-оксисукцинимидными эфирами, а в случае наличия функциональных боковых радикалов — селективный ход реакции по карбоксильной группе, а также возможность получить продукт в твёрдом виде. Недостатком является канцерогенность пентафторфенола. При активации карбоксильной группы аминокислоты имидазолидным методом использование водоотнимающего агента не требуется. Скорость реакции выше по сравнению с активированными эфирами, однако конечный имидазолид мало устойчив в растворе и

требует более тщательного подбора и осушения растворителей [10, 11].

В качестве защитных групп в пептидном синтезе наиболее часто используются *Вос* и *Z*-группы [12, 13]. Это связано с лёгкостью их введения и удаления. Постановка *Вос*-защитной группы предполагает использование ацидолиза для её удаления, а в случае *Z*-защитной группы — стадию гидрогенолиза [14]. Гидрогенолиз связан с использованием взрывоопасного водорода и дорогостоящего палладиевого катализатора. С другой стороны, он с почти 100 % выходом даёт продукт, практически не нуждающийся в дальнейшей очистке, который может быть использован на следующей стадии без выделения. Наличие остатка триптофана в структуре в конечном пептиде затрудняет применение *Вос*-защитной группы в синтезе, так как действие сильных кислот приводит к осмолению триптофана.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Нами опробованы 3 схемы синтеза дипептида ГД-102. Первая схема (схема 1) — с использованием метода активированных *N*-оксисукцинимидных эфиров; вторая схема (схема 2) — с использованием метода активированных пентафторфениловых эфиров; третья схема (схема 3) — с применением карбонилдиимидазола. Все реакции конденсации проводили в ДМФА. В качестве критериев оптимальности принимались: 1) общий выход; 2) оптическая чистота конечного продукта; 3) стоимость исходных реагентов; 4) токсичность промежуточных продуктов.

Синтез по схеме 1, как и по схеме 2, состоит из 9 стадий. На первой стадии получали *Вос*-защищенный по аминогруппе лейцин. На второй стадии получали его активированный эфир — *N*-оксисукцинимидный или пентафторфениловый, которые в дальнейшем на третьей стадии подвергали аммонолизу в растворе разбавленного водного аммиака; затем удаляли *Вос*-защитную группу ацидолизом в присутствии трифторуксусной кислоты, получая, таким образом, трифторацетат амида лейцина. На следующем этапе проводилась активация карбоксильной группы *Z*-L-триптофана получением соответствующего активированного эфира — *N*-оксисукцинимидного или пентафторфенилового; затем ацилировали полученным активированным эфиром *Z*-L-триптофана деблокированный амид лейцина. Для удаления *Z*-защитной группы триптофана использовали метод каталитического гидрогенолиза. На следующем этапе получали активированный эфир фенилпропионовой кислоты, *N*-оксисукцинимидный или пентафторфениловый, с последующим ацилированием полученным эфиром деблокированного амида L-триптофанил-L-лейцина.

Принципиальное отличие третьей схемы (схема 3) синтеза дипептида ГД-102 от двух предыдущих в том, что в качестве исходных реагентов использовали за-

щищённый сложноэфирной группой по карбоксильной группе лейцин. В этом случае нет необходимости защищать аминокгруппу лейцина, и, как следствие, в схеме будут отсутствовать две стадии: введение Вос-защитной группы и удаление её реакцией с трифторуксусной кислотой. Также активация карбоксильной группы аминокислоты с помощью карбонилдиимидазола не требует использование водоотнимающего агента, что упрощает выделение конечного продукта.

При синтезе дипептида ГД-102 по схеме 1 на первом этапе получали соответствующий amino-компонент — трифторацетат амида L-лейцина. Для этого синтезировали защищённый по аминокгруппе лейцин (Вос-L-Leu-OH) стандартным методом постановки Вос-защиты по Поздневу [12] с выходом 90 %. Полученный Вос-защищённый L-лейцин превращали в N-оксисукцинимидный эфир по методике Андерсона [8] с выходом 73 %. В качестве растворителя использовали этилацетат, реакцию проводили при комнатной температуре. От твёрдого осадка дициклогексилмочевины избавлялись фильтрованием. Далее для получения амида (Вос-L-Leu-NH₂) сукцинимидный эфир подвергали аммонолизу разбавленным водным раствором аммиака. Реакция полностью проходила в течение получаса, получаемый амид хорошо кристаллизовался и легко отделялся фильтрованием. Вос-защиту удаляли ацидолизом с использованием трифторуксусной кислоты. Признаком окончания реакции было прекращение выделения пузырьков газа. Для удаления избытка трифторуксусной кислоты реакционную смесь трижды переупаривали с диэтиловым эфиром. Продукт выделяли в виде белого кристаллического вещества растиранием с диэтиловым эфиром. На следующей стадии получали сукцинимидный эфир Z-триптофана по стандартной методике Андерсона, используя в качестве растворителя этилацетат. Получали продукт в виде пены с высоким выходом (80–95 %). Синтезированный N-оксисукцинимидный эфир Z-триптофана вводили в реакцию с трифторацетатом амида лейцина, который предварительно нейтрализовывали добавлением эквимолярного количества диизопропилэтиламина. Реакцию проводили в ДМФА, предварительно очищенном от содержащихся аминов перегонкой над нингидрином. Продукт выделяли кристаллизацией добавлением воды, фильтровали, сушили на воздухе. Продукт содержал примесь N-гидроксисукцинимиды, от которой избавлялись перекристаллизацией из системы горячий этилацетат — гексан. Полученный защищённый дипептид подвергали каталитическому гидрогенолизу в присутствии катализатора — 10 % Pd на активированном угле. Реакцию проводили в течение двух часов в закрытой системе, используя метанол в качестве растворителя. Водород подавали через газометр Берцелиуса. После прохождения реакции катализатор отделяли фильтрованием, раствор с продуктом упаривали. Важно не оставлять катализатор сухим на фильтре в связи с его пирофорностью. Полученный

N-свободный дипептид ацилировали сукцинимидным эфиром фенилпропионовой кислоты, получая конечный продукт с высоким выходом (71–80 %) кристаллизацией из дистиллированной воды. Для дополнительной очистки перекристаллизовывали из горячего этилацетата с добавлением гексана. Соединение ГД-102 имело вид белого порошка с температурой плавления 198 °С, углом вращения –27° при 25 °С, сигналы ¹H и ¹³C ЯМР спектра соответствовали структуре. Диастереомерная чистота по данным ЯМР не ниже 98 %.

Для проведения синтеза по схеме 2, защищённый лейцин (Вос-L-Leu-OH) вводили в реакцию с пентафторфенолом, в качестве водоотнимающего агента использовали дициклогексилкарбодиимид, реакцию проводили в предварительно перегнанном безводном этилацетате. Продукт получали с выходом 97 %. Выход пентафторфенилового эфира выше, чем сукцинимидного эфира в схеме 1. Пентафторфениловый эфир растворяли в небольшом количестве ДМФА и подвергали аммонолизу с использованием разбавленного водного раствора аммиака. Реакция полностью проходила в течение получаса, получаемый амид хорошо кристаллизовался и легко отделялся фильтрованием. Продукт имел вид желтоватого порошка. Однако кристаллизация продукта происходит хуже, чем в случае аммонолиза сукцинимидного эфира этой же аминокислоты. Продукт имел запах пентафторфенола даже после многократных промывок дистиллированной водой и диэтиловым эфиром. Выход составил 60 %, что может быть связано с неустойчивостью пентафторфениловых эфиров в водно-щелочных средах. Вос-защиту удаляли ацидолизом трифторуксусной кислотой как и в схеме 1. Продукт получали с выходом 89 % в виде масла. Затем получали пентафторфениловый эфир Z-триптофана. Продукт получали в кристаллическом виде с выходом 96 %, который затем вводили в реакцию конденсации с трифторацетатом амида L-лейцина, предварительно нейтральзованным эквимолярным количеством диизопропилэтиламина. Полученный дипептид кристаллизовали из дистиллированной воды. Продукт имел вид жёлтого порошка. Затем полученный защищённый дипептид подвергали каталитическому гидрогенолизу в присутствии катализатора — 10 % Pd/C по той же методике, как описано в схеме 1. Деблокированный дипептид H-L-Trp-Leu-NH₂ ацилировали пентафторфениловым эфиром фенилпропионовой кислоты. Конечный продукт плохо кристаллизовался в воде, поэтому его очищали последовательной промывкой этилацетатного раствора 5 % водным раствором NaHCO₃ и 3 % водным раствором H₂SO₄, упаривали, кристаллизовали добавлением холодной воды. Дополнительно промывали на фильтре дистиллированной водой и диэтиловым эфиром для удаления примеси пентафторфенола. Продукт содержал примесь мочевины, а также обладал жёлтым цветом и резким запахом. Попытка перекристаллизовать из системы

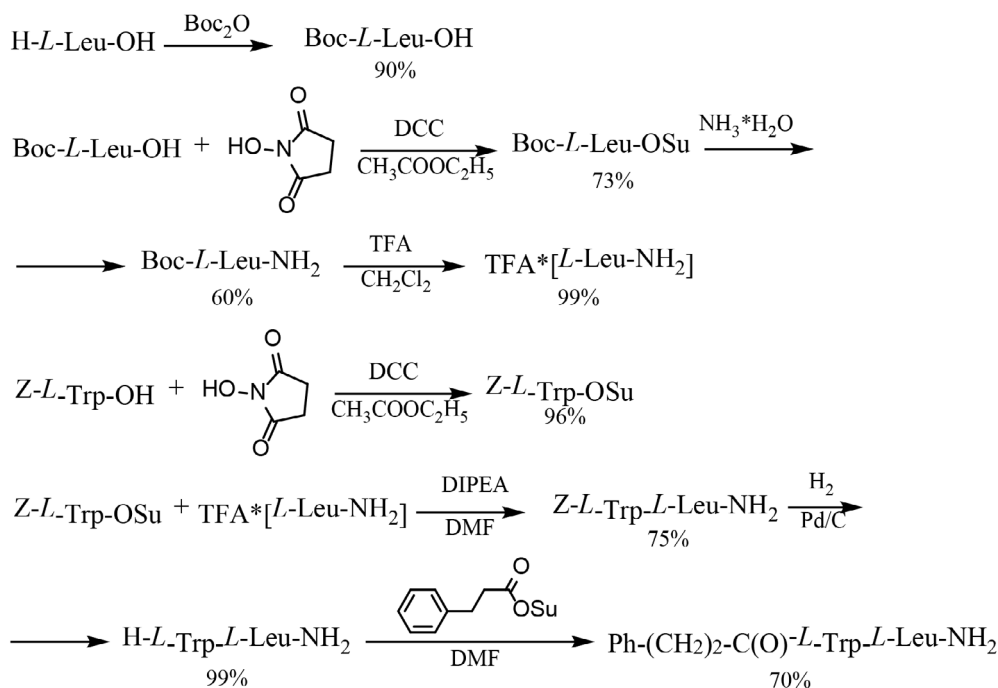


Схема 1. Получение ГД-102 методом активированных сукцинимидных эфиров
Scheme 1. Obtaining of GD-102 by activated succinimide esters

этилацетат—гексан не привело к улучшению качества продукта. Поэтому дополнительно очищали на колонке с силикагелем в системе хлористый метилен—метанол. После очистки соединение ГД-102 имело вид белого порошка с температурой плавления 178–183 °С, углом вращения –24° при 24 °С. По данным ¹Н ЯМР-спектроскопии соединение находится в форме сольвата

с метанолом в соотношении 1 молекула ГД-102 и 0,5 молекулы MeOH. Диастереомерная чистота, по данным ЯМР, не ниже 98 %.

По сравнению с методом активированных сукцинимидных эфиров (схема 1) использование метода пентафторфениловых эфиров (схема 2) увеличивает стоимость синтеза ГД-102 в 2,5 раза.

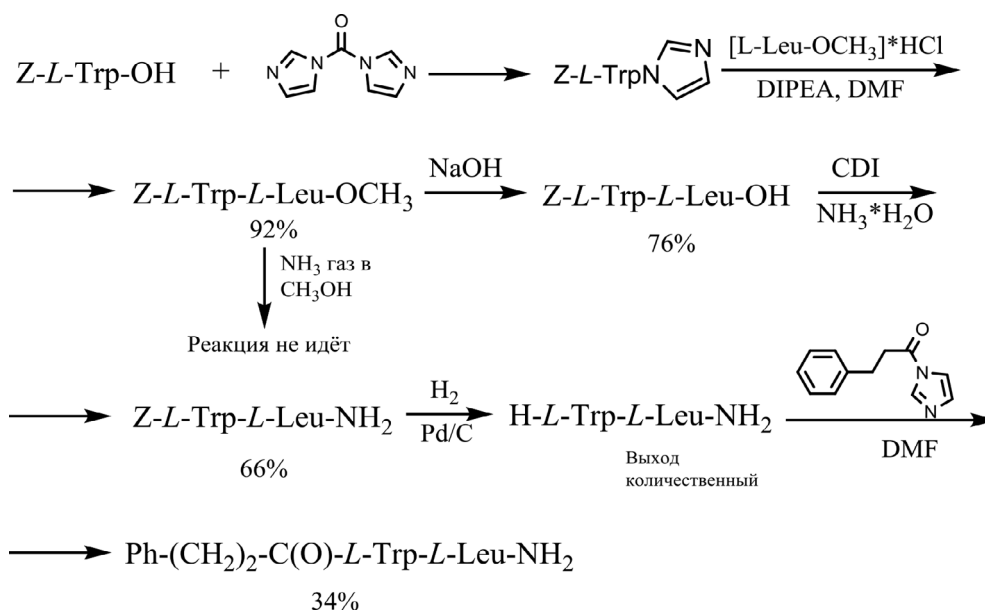


Схема 2. Получение ГД-102 методом активированных пентафторфениловых эфиров
Scheme 2. Obtaining of GD-102 by activated pentafluorophenyl esters

Имидазолид Z-L-триптофана получали в условиях Андерсона [11]. Для этого Z-Trp-OH вводили в реакцию с карбонилдимидазолом, реакцию проводили в течение получаса. Признаком окончания реакции являлось прекращение выделения пузырьков CO₂. Полученный активированный имидазолид триптофана без выделения вводили в реакцию с гидрохлоридом метилового эфира лейцина, который предварительно нейтрализовывали эквимольным количеством диизопропилэтиламина. Реакцию проводили в предварительно перегнанном над нимгидрином ДМФА. Продукт Z-L-Trp-L-Leu-OMe выделяли в виде масла. Полученный метиловый эфир попытались подвергнуть прямому аммонолизу, для чего его растворяли в метаноле, пропускали газообразный аммиак в течение получаса, однако ТСХ контроль показал, что в реакции присутствовал только исходный метиловый эфир. Поэтому для получения целевого амида Z-L-Trp-L-Leu-OMe подвергали щелочному гидролизу, получая соединение со свободной карбоксильной группой Z-L-Trp-L-Leu-OH, которое, в свою очередь, вводили в реакцию с карбонилдимидазолом и через полчаса обрабатывали водным аммиаком. Получали продукт в виде белого порошка, однако выход реакции был значительно ниже, чем при аммонолизе N-оксисукцинимидных или пентафторфениловых эфиров. Возможно, это связано с высокой скоростью распада имидазолидов в водных средах. Полученный защищённый амид дипептида подвергали каталитическому гидрогенолизу в присутствии катализатора — 10 % Pd на активированном угле по той же методике,

как в схемах 1 и 2. Деблокированный дипептид ацилировали имидазолидом фенилпропионовой кислоты, реакцию проводили в ДМФА, однако выход реакции опять же был невысоким (34 %). Возможно, это связано с малой стабильностью имидазолидов фенилалкиловых кислот. Конечный продукт выделяли кристаллизацией добавлением воды, однако он имел вид маслянистого порошка, поэтому для улучшения его физико-химических характеристик дополнительно очищали на колонке с силикагелем в системе хлористый метилен—метанол. После очистки дипептид ГД-102 имел вид белого порошка с температурой плавления 185–190 °С, углом вращения –23,6° при 24 °С. По данным ¹H ЯМР-спектроскопии, соединение находится в форме сольвата с метанолом в соотношении 1 молекула ГД-102 : 0,5 молекулы MeOH. Диастереомерная чистота, по данным ЯМР, не ниже 98 %.

Невысокие выходы реакций образования пептидной связи приводят к троекратному удорожанию синтеза конечного продукта по сравнению с методом N-оксисукцинимидных эфиров.

Для выбора наилучшего способа получения ГД-102 все преимущества и недостатки экспериментальных методов были тщательно проанализированы (табл. 1).

Как видно из табл. 1 общий выход по схеме 1 составил 42 %, по схеме 2 — 43 %, а в схеме 3 — 16 % в расчёте на коммерчески доступный Z-триптофан. Основное влияние на общий выход оказывала стадия образования пептидной связи между триптофаном и лейцином: метод N-оксисукцинимидных эфиров давал существенно больший выход по сравнению

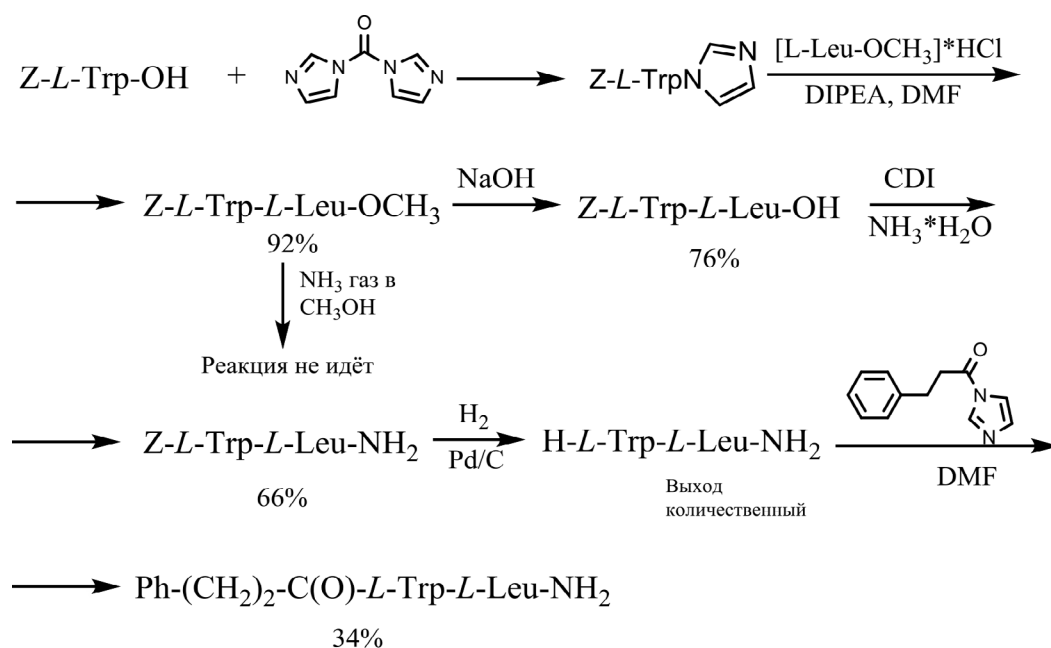


Схема 3. Получение ГД-102 имидазолидным методом
Scheme 3. Obtaining GD-102 by the imidazolidine method

Таблица 1

Сравнение методов получения дипептидного лиганда TSPO ГД-102

Table 1

Comparison of methods for obtaining the dipeptide ligand TSPO GD-102

Параметр	Метод активированных N-оксисукцинимидных эфиров	Метод активированных пентафтор-фениловых эфиров	Имидазольный метод
Метод очистки конечного продукта	1. Кристаллизация под водой 2. Перекристаллизация из системы этилацетат–гексан	1. Кристаллизация под водой 2. Колоночная хроматография на силикагеле в системе хлористый метилен–метанол	1. Кристаллизация под водой 2. Колоночная хроматография на силикагеле в системе хлористый метилен–метанол
Диастереомерная чистота	Подтверждена ЯМР	Подтверждена ЯМР	Подтверждена ЯМР
Температура плавления ГД-102	197–198 °С	178–183 °С	185–190 °С
Угол оптического вращения, с 1, ДМФА при 24 °С	–27,0°	–24,0°	–23,6°
Выход (на защищённый триптофан)	42 %	43 %	16 %
Стоимость в пересчёте на 100 г конечного продукта по ценам каталога Alfa Aesar на 2023 год	909 евро	2 323 евро	2 646 евро
Преимущества	Простота технологической схемы и используемого оборудования. Доступность исходных реагентов, возможность выделять промежуточные соединения в кристаллическом виде. Малая токсичность реагентов. Процессы протекают при комнатной температуре. Относительная дешевизна синтеза по сравнению с другими двумя схемами получения	Простота технологической схемы и используемого оборудования. Доступность исходных реагентов, возможность выделять промежуточные соединения в кристаллическом виде. Процессы протекают при комнатной температуре	Простота технологической схемы и используемого оборудования. Доступность исходных реагентов. Реакции протекают в малом промежутке времени. Процессы протекают при комнатной температуре
Недостатки	Реакции протекают в большом промежутке времени	Возможность образования токсичных примесей. Дополнительная очистка с использованием диэтилового эфира. Высокая стоимость исходных реагентов. Физико-химические константы занижены, что возможно связано с образованием сольватов с метанолом	Метод требует более тщательной подготовки и очистки растворителей и промежуточных реагентов, так как реакции влажочувствительны. Угол оптического вращения ниже, что связано с образованием сольватов с метанолом. Малые выходы реакций и, как следствие, высокая стоимость синтеза

с методом пентафторфениловых эфиров. Оптическая чистота конечных продуктов синтеза при использовании метода N-оксисукцинимидных эфиров была выше. Общий выход по схеме 3 был наименьший, что вероятно связано с низкой стабильностью имидазolidов. Получение по схемам 2 и 3 предполагает дополнительную очистку продукта на колонке, что приводит к образованию сольватов с метанолом, что было подтверждено ПМР спектром — присутствует сигнал метанола при 3,32 м. д. Метод получения ГД-102 по схеме 3 предполагает использование раствора щелочи, что также может привести к уменьшению оптической чистоты продукта.

Таким образом, оптимальной схемой для синтеза дипептидного лиганда TSPO ГД-102 явилась схема 1 с использованием метода активированных N-оксисукцинимидных эфиров, преимущества которой — больший выход продукта по сравнению со схемами 2 и 3. Кроме того, при синтезе ГД-102 по схеме 1 промежуточные вещества и конечный дипептид легко выделялись кристаллизацией и имели более высокие физико-химические показатели. Используемые исходные реагенты коммерчески доступны, малотоксичны, проводимые реакции не требуют сложного технического оснащения и условий.

По выбранной схеме было наработано необходимое количество соединения ГД-102, амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина.

Материалы и методы / Materials and methods

Список сокращений

Ar	—	арильный заместитель
Boc	—	трет-бутилоксикарбонил
CDI	—	карбонилдиимидазол
DCC	—	дициклогексилкарбодиимид
DIPEA	—	диизопропилэтиламин
DMSO	—	диметилсульфоксид
Leu	—	лейцин
OPFP	—	пентафторфенил
OSu	—	оксисукцинил
Pd/C	—	катализатор: наночастицы палладия на поверхности активированного угля
TFA	—	трифторуксусная кислота
Trp	—	триптофанил
SuOH	—	N-гидроксисукцинимид
Z	—	бензилоксикарбонил
ДМПА	—	диметилпропилендиамин
ДМФА	—	диметилформамид
ДЦГМ	—	дициклогексилмочевина
ТГФ	—	тетрагидрофуран
т.пл.	—	температура плавления
ТСХ	—	тонкослойная хроматография
ПМР	—	протонный магнитный резонанс
УФ	—	ультрафиолетовое излучение
ЭА	—	этилацетат
ЯМР	—	ядерный магнитный резонанс

Исходные вещества и вспомогательные реагенты

Аминокислоты: L-лейцин (Alfa Aesar, США), Z-L-триптофан (GL-Biochem, Шанхай). **Реагенты:** N-гидроксисукцинимид (Sigma-Aldrich, Германия), пентафторфенол, карбонилдиимидазол (Alfa Aesar, США), дициклогексилкарбодиимид (Sigma-Aldrich, Германия), дитретбутилпирикарбонат (Кемикал Лайн, Россия), трифторуксусная кислота (Химмед, Россия), катализатор Pd/C (Merck, Германия), фенилпропионовая кислота (КНР), водный аммиак (Химмед, Россия). **Растворители:** этилацетат, диметилформамид, тетрагидрофуран, диэтиловый эфир, дихлорметан, хлороформ, гексан, метанол были получены от ООО ТД Химмед (Россия).

Аналитические методы

Хроматография в тонком слое силикагеля. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в системе хлороформ:метанол 9:1, если не указана другая. Аминосодержащие соединения и соединения с концевыми амидными группами обнаруживали хлор-толидиновой пробой, содержащие ароматические группы — в УФ-лучах. **ЯМР-спектроскопия.** Спектры регистрировали при 18 °C в растворах ДМСО-d₆ в шкале δ, м. д. ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Fourier 300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Температуру плавления синтезированных соединений измеряли в открытых капиллярах с использованием автоматического прибора OptiMelt MPA 100 (Stanford Research Systems, США) и не корректировали. **Поляриметрия.** Величины оптического вращения измеряли на автоматическом цифровом поляриметре ADP 410 (Bellingham + Stanley, Великобритания) при длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм) и длине кюветы 1 дм. Величины удельных оптических вращений рассчитывали по формуле:

$$[\alpha]_D = (\alpha \times V) / (l \times a),$$

где α — наблюдаемое оптическое вращение в градусах; V — объем раствора в мл; l — толщина слоя в дм; а — навеска вещества в г.

Схема 1

Синтез дипептида ГД-102 методом активированных сукцинимидных эфиров

1. Синтез N-трет-бутилоксикарбонил L-лейцина Boc-L-Leu-OH

К суспензии 25,00 г (0,19 моль) лейцина в 200 мл изопропилового спирта добавляли 200 мл раствора 1 N NaOH. При высоких оборотах мешалки прибавляли 49,75 г (0,228 моль, 20 % избыток) ди-трет-бутилпирикарбоната (Boc₂O). Поддерживали pH=9, прикапывая 2 N раствор NaOH. Смесь перемешивали 24 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ-контроль, R_f = 0,71) упаривали до 1/3 объема, тем

самым удаляя в основном изопропиловый спирт. Полученный раствор экстрагировали гексаном (3×100 мл) для удаления избыточного Woc_2O . Водную фракцию отделяли, подкисляли при перемешивании 10 % раствором H_2SO_4 до выпадения осадка ($\text{pH} = 3-4$). Осадку давали сформироваться в холодильнике в течение 24 ч, после чего отфильтровывали, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Сушили в фарфоровой чашке на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы. Выход: 70,34 г (90 %), т. пл. 86–87 °С, $[\alpha]_{20}^D = -23$ (с 1, уксусная кислота). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ , м.д.: 0,82–0,85 (6 H, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,22 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,36 (9 H, с, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1,45 (2 H, м, C^{β}H Leu), 3,86–3,88 (1 H, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 6,72 (1 H, д, NH Leu).

2. Синтез сукцинимидного эфира N-трет-бутоксикарбонил-L-лейцина Woc-L-Leu-OSu

К суспензии 6,00 г (25,97 ммоль) Woc-L-Leu-OH в 150 мл ЭА добавили 3,58 г SuOH. Смесь охладили на водяной бане до 5–7 °С, после чего добавили 6,42 г (31,17 ммоль) DCC. Наблюдали выпадение осадка ДЦГМ. Реакционной массе дали самостоятельно нагреться до комнатной температуры, затем вели реакцию при перемешивании ещё в течение 5 часов. По окончании реакции (ТСХ контроль, $R_f = 0,81$) осадок ДЦГМ отфильтровали, ЭА удаляли в вакууме. Остаток растерли с диэтиловым эфиром, эфир декантировали. Получили 6,15 г (73 %) продукта в виде белого порошка с т.пл. 110–112 °С; $[\alpha]_{24}^D = -36^\circ$ (с 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,39 (9 H, с, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1,45 (2 H, т, C^{β}H Leu), 1,56–1,73 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 2,82 (4 H, м, OSu), 3,86–3,88 (1 H, м., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 7,93 (1 H, д, NH Leu).

3. Синтез амида N-трет-бутилоксикарбонил-L-лейцина Woc-L-Leu-NH₂

К раствору 6,00 г Woc-L-Leu-OSu в 30 мл ДМФА при перемешивании приливали 80 мл разбавленного в 2 раза продажного водного раствора аммиака, сразу выпадал белый творожистый осадок. Суспензию разбавляли дистиллированной водой для комфортного перемешивания. Реакцию вели в течение часа, после чего осадку давали сформироваться в холодильнике в течение 24 ч. Отфильтровывали и промывали полученный осадок дистиллированной водой до нейтральной реакции. Сушили в сушильном шкафу при 80 °С в течение 5 ч до постоянной массы. Выход 5,3 г, 60 %, т. пл 148–149 °С, $[\alpha]_{26}^D = -11^\circ$ (с 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ , м.д.: 0,82–0,85 (6 H, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,22 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,36 (9 H, с, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1,45 (2 H, м, C^{β}H Leu), 3,86–3,88 (1 H, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 6,72 (1 H, д, NH Leu), 6,89 и 7,19 (2 H, два с, NH₂ амид).

4. Синтез трифторацетата амида L-лейцина [L-Leu-NH₂] $\times$ TFA

К 12,00 г Woc-Leu-NH₂, (52,1 ммоль) добавляли 30 мл дихлорметана и затем к полученной суспензии при перемешивании одномоментно прибавили 60 мл

TFA (89,1 г, 1500 % избыток). Перемешивали получившийся светло-жёлтый раствор 2 часа. Избыток TFA упаривали, остаток затем трижды переупаривали с диэтиловым эфиром. Полученный легко кристаллизующийся остаток вновь залили эфиром, растёрли, дали сформироваться в течение 2 ч, затем отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром, высушивали в сушильном шкафу при 45–50 °С. Выход 11,88 г (99 %), т. пл. 118–119 °С, $[\alpha]_{25}^D = -18^\circ$ (с 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ , м.д.: 0,83–0,89 (6 H, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,22 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,36 (9 H, с, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1,45 (2 H, м, C^{β}H Leu), 3,69 (1 H, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 7,52 и 7,93 (2 H, два с., NH₂ амид), 8,12 (3 H, уш. с., N^+H_3 Leu).

5. Синтез сукцинимидного эфира N-бензилоксикарбонил-L-триптофана Z-L-Trp-OSu

К раствору 10,00 г (29,6 ммоль) Z-L-TrpOH в 300 мл этилацетата добавляли 3,98 г (34,6 ммоль, 17 % избыток) N-гидроксисукцинимид, смесь охлаждали на водяной бане до 5–7 °С и затем прибавляли 7,25 (35,2 ммоль, 19 % избыток) дицилогексилкарбодиимида. Реакционную массу перемешивали 30 мин при температуре +5 – +7 °С и затем 12 ч при комнатной температуре. Осадок дицилогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученное масло растирали с гексаном, гексан декантировали, масло упаривали досуха. Получали продукт в количестве 11,84 г (92 %) в виде белой пены, которую измельчали до состояния порошка с т.пл. 137–140 °С $[\alpha]_{25}^D = -60,0^\circ$ (с 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР ДМСО- d_6 , δ м.д.: 2,78 (4 H, м, OSu), 3,01 и 3,25 (2 H, два д.д., C^{β}H Trp), 3,98 (1 H, м, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 4,97 (2 H, с, $-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 6,73–7,62 (10 H, м, $-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, индол), 8,56 (1 H, д, NH Trp), 10,78 (1 H, с, NH индол).

6. Синтез амида N-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина Z-L-Trp-Leu-NH₂

Растворяли 7,06 г (13,52 ммоль) [L-Leu-NH₂] $\times$ TFA в 10 мл ДМФА. Добавляли DIPEA (2,35 мл, 5 % избыток) для нейтрализации трифторуксусной кислоты, перемешивали в течение 30 мин. Затем добавляли этот раствор к раствору – 7,06 г Z-L-Trp-OSu (16,22 ммоль 20 % избыток) в 100 мл ДМФА. Реакцию вели сутки при перемешивании при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ-контроль, $R_f = 0,76$) растворитель упаривали, результирующее масло растворяли в 100 мл ЭА, этот раствор экстрагировали 5 % NaHCO_3 (2×100 мл), 3 % водным раствором H_2SO_4 (2×100 мл) и затем дистиллированной водой (2×100 мл). Органическую фракцию сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 минут, осушитель отфильтровывали, промывали небольшим количеством ЭА, упаривали. К ещё подвижному маслу приливали 100 мл дистиллированной воды, образовывался белый осадок, которому давали сформироваться в холодильнике в течение 12 ч, затем фильтровали, промывали 100 мл дистиллированной воды, 50 мл гексана, 50 мл диэтилового эфира, высушивали на воздухе. Выход: 6,78 г, (75 %), т.пл.: 166–169 °С,

$[\alpha]_{26}^D = -31,5^\circ$ ($c = 1$, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д д, $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,22 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,45 (2 H, м, C^{β}H Leu), 2,90 и 3,09 (2 H, два дд, C^{β}H Trp), 4,28–4,31 (2 H, м, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu и $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 4,93 (2 H, м, CH_2CO), 6,99–7,30 (10 H, м, Ar), 7,25 и 7,33 (2 H, два с, NH_2 амид), 7,62 (1 H, д, NH Leu), 7,97 (1 H, д, NH Trp), 10,81 (1 H, с, NH индол).

7. Синтез амида L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Trp-L-Leu-NH₂

К 6,78 г (15,0 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-NH₂ приливали 50 мл метанола, к полученной суспензии добавляли суспензию 0,50 г 10 % Pd/C предварительно смоченного 2 мл дистиллированной воды. Через полученную суспензию при перемешивании пропускали ток водорода в течение 3 часов при интенсивном перемешивании. Через 3 часа исходный продукт растворялся, что свидетельствовало о прохождении реакции. По окончании реакции катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, подложив на дно фильтра бумагу маркировки «чёрная лента». Фильтрат упаривали, получали продукт в виде пены серого цвета. Выход: 4,71 г (99 %) без чёткой т.пл., $[\alpha]_{26}^D = -25^\circ$ ($c = 1$, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 дд, $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,09–1,26 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,45 (2 H, м, C^{β}H Leu), 2,90 и 3,08 (2 H, два дд, C^{β}H Trp), 3,50 (1 H, м, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 4,14 (1 H, дд, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 6,94–7,55 (5 H, м, индол), 7,05 и 7,41 (2 H, 2 д, NH_2 амид), 7,60 (1 H, д, NH Leu), 8,05 (1 H, д, NH Trp), 10,85 (2 H, уш с, NH_2 индол).

8. Синтез сукцинимидного эфира фенилпропионовой кислоты Ph-(CH₂)₂-C(O)-OSu

К раствору 4,00 г (26,66 ммоль) фенилпропионовой кислоты в 100 мл THF прибавляли 3,68 г (32 ммоль, 20 % изб.) SuOH, затем 6,59 г (32 ммоль, 20 % изб.) DCC, охлаждение реакционной смеси не требовалось, реакцию вели при комнатной температуре 12 ч, по мере прохождения реакции выпадал осадок ДЦГМ. По окончании реакции осадок ДЦГМ отфильтровывали, растворитель упаривали в вакууме, получали белый порошок, который сушили в вакуумном эксикаторе над безводным Na_2SO_4 . Выход 6,55 г (99 %) продукта в виде белого порошка с т.пл. = 113–114 °C, $R_f = 0,81$, ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ , м.д.: 2,81 (4 H, м, OSu), 2,97–3,01 (2 H, м, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 3,34 (2 H, с, CH_2CO), 7,16–7,31 (5 H, м, C_6H_5).

9. Синтез амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина Ph-(CH₂)₂-C(O)-L-Trp-L-Leu-NH₂ (ГД-102)

Растворяли 4,50 г (14,3 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-NH₂ в 50 мл ДМФА, добавляли 3,86 г (15,6 ммоль, 10 % изб.) сукцинимидного эфира фенилпропионовой кислоты, перемешивали 24 ч. Затем добавляли 0,30 мл ДМПА, для удаления избытка $\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{OSu}$, перемешивали ещё полчаса, растворитель удаляли в вакууме. Результирующее масло разбавляли 200 мл дистиллированной воды, получали белый «молочный» осадок. Осадку давали выстоять 12 ч в холодильнике

ке при температуре +8 °C, затем отфильтровывали. Полученный порошок промывали 100 мл дистиллированной воды, 100 мл гексана и 50 мл диэтилового эфира. Затем перекристаллизовывали из системы этилацетат–гексан, растворяя в горячем этилацетате и при перемешивании прибавляя гексан до выпадения осадка. Сушили в вакуумированном эксикаторе над CaCl_2 . Выход составил 4,49 г (70 %) продукта в виде белого порошка с т.пл. 197–198 °C, $[\alpha]_{26}^D = -27^\circ$ ($c = 1$, ДМФА), $R_f = 0,73$ (CHCl_3 :MeOH 9:1). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д д, $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,45 (2 H, т, C^{β}H Leu), 1,56–1,73 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 2,38 (2 H, т, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 2,69 (2 H, т, CH_2CO), 2,90 и 3,09 (2 H, два дд, C^{β}H Trp), 4,22 (1 H, дд, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 4,54 (1 H, м, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 6,99–7,20 (10 H, м, Ar), 7,33 и 7,60 (2 H, два с, NH_2 амид), 7,93 (1 H, д, NH Leu), 8,08 (1 H, д, NH Trp), 10,78 (1 H, с, NH индол).

Схема 2

Синтез дипептида ГД-102 методом активированных пентафторфениловых эфиров

1. Синтез пентафторфенилового эфира N-трет-бутилоксикарбонила-L-лейцина Boc-L-Leu-OPfP

К раствору 2,50 г (10,82 ммоль) Boc-L-Leu-OH в этилацетате при перемешивании добавили 2,32 г (12,65 ммоль, 17 % изб.) пентафторфенола, затем 2,60 г (12,65 ммоль, 17 % изб.) DCC. Наблюдали выпадение ДЦГМ. Реакцию перемешивали 3 часа при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль) осадок ДЦГМ отфильтровывали. Полученный раствор в этилацетате экстрагировали 5 % водным раствором NaHCO_3 (2×100 мл) и 5 % водным раствором NaCl (1×100 мл). Органическую фракцию сушили над безводным Na_2SO_4 полчаса. Фильтровали, растворитель удаляли в вакууме, получали 4,2 г продукта в виде масла. Выход 97 %. Дополнительного подтверждения структуры не требовалось.

2. Синтез амида N-трет-бутилоксикарбонил-L-лейцина, Boc-L-Leu-NH₂

К раствору 4,2 г (10,57 ммоль) Boc-L-Leu-OPfP в 5 мл ДМФА приливали 70 мл разбавленного (продажный раствор разбавляли в 2 раза) водного раствора аммиака. Смесь перемешивали в течение 20 минут, после чего оставили для кристаллизации на 24 часа при температуре +5 °C. Выпавший кристаллический осадок белого цвета отфильтровывали. Получили 1,45 г продукта. Выход 60 % в виде желтоватого порошка, т.пл. 142–143 °C, $[\alpha]_{26}^D = -8,7^\circ$ ($c = 1$, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ , м.д.: 0,84 (6 H, м, $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,22–1,26 (2 H, т, C^{β}H Leu), 1,36 (9H, с, Boc), 1,57–1,79 (1 H, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 3,86–3,88 (1 H, дд, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 6,72 (1 H, д, NH Leu), 6,89 и 7,19 (2 H, два с, NH_2 амид),

3. Синтез трифторацетата амида L-лейцина, [L-Leu-NH₂] $\times$ TFA

К 1,31 г Boc-L-Leu-NH₂ (5,69 ммоль) в 40 мл хлористого метилена при перемешивании добавили 6,54 мл

(85,43 ммоль) TFA, реакцию вели 2 часа. По окончании реакции (ТСХ контроль) смесь упарили, затем перепарили с диэтиловым эфиром 3×30 мл и оставили для кристаллизации под 60 мл диэтилового эфира на 24 часа, после чего эфир декантировали. Кристаллический остаток отфильтровали, высушили в сушильном шкафу при 45–50 °С. Выход составил 1,23 г (89 %) в виде белого порошка, с т.пл. 135–136 °С, $[\alpha]_{25}^D = +17,5^\circ$ (с = 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ , м.д.: 0,83–0,88 (6 Н, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,22 (1 Н, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,45 (2 Н, м, C^{β}H Leu), 3,69 (1 Н, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 7,52 и 7,93 (2 Н, два с, NH_2 амид), 8,12 (3 Н, уш. с, N^+H_3 Leu).

4. Синтез пентафторфенилового эфира N-бензилоксикарбонила-L-триптофана, Z-L-Trp-OPfP

К 4,00 г (11,83 ммоль) суспензии Z-L-Trp-OH в 150 мл этилацетата. добавили 2,6 г (14,20 ммоль, 20 % избыток) пентафторфенола и 2,93 г (14,20 ммоль, 20 % избыток) дицилогексилкарбодиимида. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов. Наблюдали выпадение белого осадка ДЦГМ. По окончании реакции (ТСХ контроль) осадок ДЦГМ отфильтровали. Фильтрат экстрагировали однократно по 100 мл 5 % раствором NaHCO_3 , затем 3 % H_2SO_4 и насыщенным раствором NaCl. Органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 минут. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали в вакууме. Получали продукт в виде вязкого жёлтого масла с крупинками. Выход составил 5,7 г (95 %). Характеристики соответствуют литературным данным, дополнительного подтверждения структуры не требовалось.

5. Синтез амида N-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-NH₂

В 20 мл ДМФА растворили 1,11 г (4,55 ммоль) $\text{TFA} \times \text{L-Leu-NH}_2$, добавили 0,99 мл (5,69 ммоль) DIPEA для нейтрализации и оставили при перемешивании на 30 минут. После этого внесли в этот раствор 2,64 г (5,23 ммоль, 20 % изб.) Z-L-Trp-OPfP. Реакцию вели при комнатной температуре 12 ч. По окончании реакции (ТСХ контроль) добавили 0,114 мл DMAPA для удаления избытка Z-L-Trp-OPfP и перемешивали в течение 10 минут. ДМФА упаривали, остаток растворили в 100 мл этилацетата. Экстрагировали двукратно по 100 мл 3 % раствором H_2SO_4 , 5 % раствором NaHCO_3 и затем однократно 100 мл дистиллированной воды. Органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 минут. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали. К ещё подвижному тёплому маслу добавили 200 мл дистиллированной воды для кристаллизации. Выпавшему осадку давали выстоять в холодильнике 12 ч, затем фильтровали, промывали водой, затем гексаном. Получили 1,3 г (65 %) продукта в виде белого порошка с т. пл. 166–169 °С, $[\alpha]_{26}^D = -31^\circ$ (с = 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ , м.д.: 0,83–0,85 (6 Н, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,08–1,17 (1 Н, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,46–1,49 (2 Н, м, C^{β}H Leu), 2,90 и 3,09

(2 Н, два д.д., C^{β}H Trp), 4,26–4,31 (2 Н, м., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu и $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 4,95 (2 Н, м, CH_2CO), 6,69–7,22 (10 Н, м, Ar) 7,25 и 7,33 (2 Н, два с, NH_2 амид), 7,62 (1 Н, д, NH Leu), 7,97 (1 Н, д, NH Trp), 10,82 (1 Н, с, NH индол).

6. Синтез амида L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Trp-L-Leu-NH₂

К 2,05 г (4,55 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-NH₂ приливали 50 мл метанола, добавляли 0,346 г 10 % Pd/C в качестве катализатора, предварительно смоченного несколькими каплями воды. Через полученную суспензию при перемешивании пропускали ток водорода в течение 3 часов при интенсивном перемешивании. По окончании реакции (ТСХ контроль) катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, подложив на дно фильтра бумагу маркировки «чёрная лента», промывали 50 мл метанола. Фильтрат упаривали, получали продукт с выходом 1,4 г (97 %) в виде серой пены без четкой температуры плавления, $[\alpha]_{26}^D = -25^\circ$ (с = 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 Н, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,09–1,26 (1 Н, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1,45 (2 Н, м, C^{β}H Leu), 2,90 и 3,08 (2 Н, два д.д., C^{β}H Trp), 3,50 (1 Н, м, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 4,14 (1 Н, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 6,94–7,55 (5 Н, м, Ar), 7,05 и 7,41 (2 Н, 2 д, NH_2 амид), 7,60 (1 Н, д, NH Leu), 8,05 (1 Н, д, NH Trp), 10,85 (1 Н, уш. с, NH индол).

7. Синтез амида фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, Ph-(CH₂)₂-C(O)-L-Trp-L-Leu-NH₂

К 1,4 г (4,22 ммоль) в 30 мл ДМФА добавляли 1,6 г (5,07 ммоль, 20 % изб.) $\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{-OPfP}$. Реакционную смесь оставляли на 12 часов с хлоркальциевой трубкой при перемешивании. По окончании реакции (ТСХ контроль) ДМФА упарили, остаток растворили в 100 мл этилацетата. Экстрагировали двукратно по 100 мл 3 % H_2SO_4 , 5 % NaHCO_3 и затем однократно 100 мл дистиллированной воды. Органическую фракцию сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 минут. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали. Получали 1,3 г продукта в виде желтоватого порошка, с т. пл. 168–172 °С. Продукт дополнительно очищали на колонке с силикагелем для повышения показателей чистоты и улучшения физико-химических характеристик. Набивали колонку силикагелем 60 Å в соотношении 1:15 к массе очищаемого вещества. Прогоняли системы: 100 мл хлористый метилен 100 %, 30 мл хлористый метилен:метанол 99:1, 30 мл хлористый метилен:метанол 90:10, 30 мл хлористый метилен:метанол 85:15, 30 мл хлористый метилен:метанол 80:20, 30 мл хлористый метилен:метанол 70:30. Выход продукта в виде белого порошка 0,780 г (60 %) с т. пл. 178–183 °С, $[\alpha]_{24}^D = -24^\circ$ (с = 1, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 Н, 2 д.д., $2\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu), 1,45 (2 Н, т, C^{β}H Leu), 1,56–1,73 (1 Н, м, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 2,37 (2 Н, т, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 2,69 (2 Н, т, CH_2CO), 2,90 и 3,09 (2 Н, два д.д., C^{β}H Trp), 4,22 (1 Н, д.д., $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu), 4,56 (1 Н, м, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp), 6,99–7,29 (10 Н, м, Ar), 7,20 и 7,58 (2 Н, два с, NH_2 амид), 7,93 (1 Н, д, NH Leu), 8,05 (1 Н, д, NH Trp), 10,79 (1 Н, с, NH индол).

Схема 3

Синтез дипептида ГД-102 имидазольным методом

1. Синтез метилового эфира N-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-OSCH₃

К Z-L-Trp-ОН 1 г (2,956 ммоль), растворённому в 15 мл ТГФ, добавляли 0,479 г (2,956 ммоль) CDI. Отдельно растворяли 0,537 г (2,956 ммоль) [L-Leu-OSCH₃]×HCl в ТГФ и 0,515 мл DIPEA. Оба раствора перемешивали полчаса, затем объединяли и перемешивали ещё час при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе бутанол:уксусная кислота:вода 4:1:1, R_f = 0,78, УФ и толидиновая проба) упаривали до густого жёлтого масла, разбавляли 50 мл ЭА и экстрагировали NaHCO₃ 5 % (2×50 мл) и дист. водой (1×30 мл). Органическую фракцию высушивали над безводным MgSO₄ в течение 30 минут, осушитель отфильтровывали и упаривали до состояния аморфной жёлтой пены, которую затем дважды переупаривали с диэтиловым эфиром. Выход составил 1,26 г (92 %) продукта с [α]₂₄^D = -21,6° (с 1, ДМФА). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ, м.д.: 0,83–0,88 (6 H, м, 2C^δH₃ Leu), 1,06–1,35 (2 H, т, C^βH Leu), 1,58 (1 H, м, C^γH₂ Leu), 2,90 и 3,06 (2 H, два д.д., C^βH Trp), 3,63 (3 H, с, -OCH₃), 4,29 (1 H, д.д., C^αH Leu), 4,41 (1 H, м, C^αH Trp), 4,96 и 5,02 (2 H, 2 д, -OCH₂C₆H₅), 6,98–7,51 (10 H, м, Ar), 7,67 (1 H, д, NH Trp), 8,27 (1 H, д, NH Leu), 10,83 (1 H, с, NH индол).

2. Синтез N-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-ОН.

Растворяли 1,38 г (2,96 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-OMe в 10 мл метанола, при перемешивании приливали раствор 0,24 г (5,2 ммоль, 100 % избыток) NaOH в 5 мл воды. Перемешивали в течение 3 часов до полного растворения реакционной массы. После чего разбавляли 100 мл воды, при перемешивании прикапывали 10 % H₂SO₄ до pH 4–5, при этом выпадал молочный осадок, которому давали выстоять 12 ч в холодильнике при +8 °С. Затем раствор над осадком аккуратно декантировали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, экстрагировали дистиллированной водой (2×100 мл), органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na₂SO₄ в течение получаса. Осушитель отфильтровывали, раствор упаривали, после чего переупаривали 3 раза с диэтиловым эфиром до получения белой устойчивой пены. Пену измельчали, переносили на стеклянный фильтр и промывали гексаном. Выход составил 2,18 г (76 %) продукта с т. пл. 91–92 °С, [α]₂₉^D = -19,8° (с = 1, ДМФА). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ, м.д.: 0,83–0,88 (6 H, м, 2C^δH₃ Leu), 1,06–1,35 (2 H, т, C^βH Leu), 1,58 (1 H, м, C^γH₂ Leu), 2,34 (2 H, м, CH₂ Leu), 2,69 (H, м, CH Leu), 2,92 и 3,08 (2 H, два д.д., C^βH Trp), 3,61 (3 H, с, -OCH₃), 4,32 (1 H, д.д., C^αH Leu), 4,61 (1 H, м, C^αH Trp), 6,91–7,61 (10 H, м, Ar), 8,02 (1 H, д, NH Trp), 8,35 (1 H, д, NH Leu), 10,91 (1 H, с, NH индол), 12,63 (1 H, ушир. с, OH).

3. Синтез амида N-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-NH₂

К 2,00 г (4,43 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-ОН в растворе 15 мл ТГФ добавляли 0,79 г (4,87 ммоль, 10 % изб.) CDI, перемешивали полчаса, затем добавляли смесь 50 мл ДМФА и 10 мл водного аммиака, получили ярко-жёлтый раствор. По окончании реакции (ТСХ контроль, R_f = 0,62) упаривали растворители в вакууме, разбавляли 50 мл ЭА, экстрагировали дистиллированной водой (2×30 мл), органическую фазу сушили над Na₂SO₄ в течение 30 минут, затем осушитель отфильтровывали и упаривали. Выход составил 1,32 г (66 %) продукта в виде белого порошка с т.пл. = 180–182 °С [α]₂₃^D = -25,9° (с 1, ДМФА). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ, м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д.д., 2C^δH₃ Leu), 1,08–1,22 (1 H, м, C^γH₂ Leu), 1,45 (2 H, м, C^βH Leu), 2,96 и 3,12 (2 H, два д.д., C^βH Trp), 4,28–4,91 (1 H, м, C^αH Leu), 4,38 (1 H, м, C^αH Trp), 4,93 (2 H, 2 д, -OCH₂C₆H₅), 6,94–7,30 (10 H, м, -OCH₂C₆H₅, индол), 7,14 и 7,30 (2 H, два с, NH₂ амид), 7,62 (1 H, д, NH Trp), 7,97 (1 H, д, NH Leu), 10,81 (1 H, с, NH индол).

4. Синтез амида L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Trp-L-Leu-NH₂.

В колбу, содержащую суспензию из 1,26 г (3,72 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-NH₂ в 100 мл метанола добавили 500 мг 10 % Pd/C смоченного 1 мл дистиллированной воды. Через полученную смесь пропускали водород в течение 2 часов при интенсивном перемешивании. Получали растворимый в метаноле продукт, что свидетельствовало о прохождении реакции. Катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, проложив фильтрующее дно бумагой маркировки «чёрная лента», промывали метанолом. Фильтрат упаривали, получали 4,15 г продукта в виде кремовой аморфной пены с [α]₂₆^D = -28,6° (с = 1, ДМФА), R_f = 0,35, без чёткой т.пл. Выход количественный. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ, м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д.д., 2C^δH₃ Leu), 1,09–1,26 (1 H, м, C^γH₂ Leu), 1,45 (2 H, м, C^βH Leu), 2,75 и 3,11 (2 H, два д.д., C^βH Trp), 3,50 (1 H, м, C^αH Trp), 4,14 (1 H, д.д., C^αH Leu), 6,94–7,55 (5 H, м, индол), 7,05 и 7,41 (2 H, 2 д, NH₂ амид), 7,95 (1 H, д, NH Leu), 10,85 (2 H, уш с, NH₂ Trp).

5. Синтез амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, N-Ph(CH₂)₂C(O)-L-Trp-L-Leu-NH₂ (ГД-102)

Растворяли 2,04 г (13,61 ммоль) фенилпропионовой кислоты в 30 мл ДМФА, добавляли 2,20 г (13,61 ммоль) CDI, перемешивали полчаса при комнатной температуре. Затем к этому раствору прибавили 4,10 г (12,37 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-NH₂ в 20 мл ДМФА, перемешивали ещё 5 ч при комнатной температуре. Растворитель упаривали, остаток растворили в 100 мл этилацетата. Экстрагировали двукратно по 100 мл 3 % водным раствором H₂SO₄, 5 % раствором NaHCO₃, и затем однократно 100 мл насыщенного раствора NaCl. Органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na₂SO₄ в течение 30 минут. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали.

К образовавшемуся подвижному маслу добавляли 5 мл ДМФА и 200 мл дистиллированной воды для кристаллизации. Получали жёлтое карамелеобразное масло, которое выдерживали в холодильнике до кристаллизации (48 часов). Выход составил 1,95 г (34 %) порошка кремового цвета с т.пл. 178–180 °С. Продукт дополнительно очищали на колонке с силикагелем для повышения показателей чистоты. Набивали колонку силикагелем 60 Å в соотношении 1:15 к массе очищаемого вещества. Прогоняли системы: 100 мл хлористый метилен 100 %, 30 мл хлористый метилен:метанол 99:1, 30 мл хлористый метилен:метанол 90:10, 30 мл

хлористый метилен:метанол 85:15, 30 мл хлористый метилен:метанол 80:20, 30 мл хлористый метилен:метанол 70:30. Выход 1,61 г (82 %) продукта в виде белого порошка с т. пл. 185–190 °С, $[\alpha]_{24}^D = -23,6^\circ$ ($c = 1$, ДМФА). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ , м.д.: 0,82–0,88 (6 H, 2 д.д., $2\text{C}^\delta\text{H}_3$ Leu), 1,45 (2 H, т, C^βH Leu), 1,56–1,73 (1 H, м, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Leu), 2,38 (2 H, т, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 2,69 (2 H, т, CH_2CO), 2,90 и 3,09 (2 H, два д.д., C^βH Trp), 4,22 (1 H, д.д., C^αH Leu), 4,54 (1 H, м, C^αH Trp), 6,99–7,20 (10 H, м, Ar), 7,33 и 7,60 (2 H, два с, NH_2 амид), 7,93 (1 H, д, NH Leu), 8,08 (1 H, д, NH Trp), 10,78 (1 H, с, NH индол).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Деева Ольга Алексеевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: olga.angstrem@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9842-1545>

SPIN-код: 8877-9489

н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов
отдела химии лекарственных средств ФГБНУ
«ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация

Olga A. Deeva

Corresponding author

e-mail: olga.angstrem@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9842-1545>

SPIN code: 8877-9489

Researcher of the peptide bio regulators labora-
tory at the medicinal chemistry department
Federal Research Center for Innovator and
Emerging Biomedical and Pharmaceutical
Technologies, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

- Gudasheva TA, Deeva OA, Mokrov GV, et al. Design, Synthesis and Anxiolytic Activity Evaluation of N-Acyltryptophanyl-Containing Dipeptides, Potential TSPo Ligands. *Med Chem.* 2019;15(4):383–399. DOI: 10.2174/157340641566618119164846.
- Деева О.А., Пантеев А.С., Рыбина И.В. и др. Новый дипептидный лиганд TSPo. *Доклады академии наук.* 2018;484(2):228–232.
- Deeva OA, Pantileev AS, Rybina IV, et al. A novel dipeptide ligand of TSPo. *Dokl Biochem Biophys.* 2019;484(1):17–20. (In Russ.). DOI: 10.1134/S1607672919010046.
- Гудашева Т.А. Теоретические основы и технологии создания дипептидных лекарств. *Известия Академии наук. Серия химическая.* 2015;64(9):2012–2021.
- Gudasheva TA. Theoretical grounds and technologies for dipeptide drug development. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya.* 2015;64(9):2012–2021. (In Russ.). DOI: 10.1007/s11172-015-1112-2.
- Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. Novel Technologies for Dipeptide Drugs Design and their Implantation. *Curr Pharm Des.* 2018;24(26):3020–3027. DOI: 10.2174/1381612824666181008105641.
- Zivkovic B, Morel E, Joly D, et al. Pharmacological and behavioral profile of alpidem as an anxiolytic. *Pharmacopsychiatry.* 1990 May;23 Suppl 3: 108–113. DOI: 10.1055/s-2007-1014545.
- Gudasheva TA, Deeva OA, Pantileev AS, et al. The New Dipeptide TSPo Ligands: Design, Synthesis and Structure-Anxiolytic Activity Relationship. *Molecules.* 2020 Nov 4;25(21):5132. DOI: 10.3390/molecules25215132.
- Химический синтез пептидов / Гершкович А.А., Кибирев В.К.; Отв. ред. Серебряный С. Б.; АН Украины. Ин-т биоорган, химии и нефтехимии. Киев : Наук, думка, 1992. 360 с.

- Himicheskij sintez peptidov. Gershkovich AA, Kibirev VK; Ed. Silver SB.; AN Ukrainy. In-t bioorgan, himii i neftekhimii. Kiev. Nauk, dumka. 1992. (UKR.).
- Anderson GW, Zimmerman JE, Callahan FM. (1963). N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society.* 1963;85(19):3039–3039. DOI: 10.1021/ja00902a047.
- Kisfaludy L, Roberts JE, Johnson RH, et al. Synthesis of N-carbobenzoxycarboxylic acid and peptide pentafluorophenyl esters as intermediates in peptide synthesis. *J Org Chem.* 1970 Oct;35(10):3563–3565. DOI: 10.1021/jo00835a086.
- Anderson GW, Paul R. N,N'-Carbonyldiimidazole, a new reagent for peptide synthesis. *J Am Chem Soc.* 1958;80:4423–4431. DOI: 10.1021/ja01549a078.
- Anderson GW, Paul R. N,N'-Carbonyldiimidazole, a new peptide forming reagent. *J Am Chem Soc.* 1960;82:4596–4603. DOI: abs/10.1021/ja01502a038.
- Позднеев В.Ф. Применение Ди-трет-бутилпирокарбоната для получения N-трет-бутилоксикарбонильных производных аминокислот. *Химия природных соединений.* 1974;6:764–767.
- Pozdnev VF. Primenenie Di-tret-butilpirokarbonata dlya polucheniya N-tret-butiloksikarbonil'nyh proizvodnyh aminokislot. *Himiya prirodnyh soedinenij.* 1974;6:764–767. (In Russ.).
- Bergmann M, Zervas L. Über ein allgemeines verfahren der peptid-synthese. *Ber chem.* 1932;65(7):1192–1201 (In German). DOI: 10.1002/cber.19320650722.
- МакОми Дж. Защитные группы в органической химии. М.: Издательство «Мир», 1973.
- McOmie JFW. Protective groups in organic chemistry. Plenum Press. London and New York, 1973.