

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ
АРМЕНИЯ

Հայաստանի քիմիական հանդես 63, №1, 2010 Химический журнал Армении

УДК 547.466

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ ДИ- И ТРИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОПТИЧЕСКИ
АКТИВНЫЕ НЕБЕЛКОВЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ –
 α -АЛЛИЛГЛИЦИН И β -(N-ИМИДАЗОЛИЛ)АЛАНИН

Ю. М. ДАНГЯН, Т. О. САРГСЯН, С. М. ДЖАМГАРЯН, Э. А. ГЮЛУМЯН,
Г. А. ПАНОСЯН и А. С. САГИАН

Научно-исследовательский институт биотехнологии
Армения, 0056, Ереван, ул. Гюрджяна, 14
Факс: (374 10) 654 183 E-mail: biotech@netsys.am
Центр исследования строения молекул
Армения, 0014, Ереван, пр. Азатутян, 26

Впервые синтезированы производные ди- и трипептидов с использованием оптически чистых небелковых аминокислот – (*S*)- и (*R*)- α -аллилглицинов, (*S*)- и (*R*)- β -(N-имидазолил)аланинов. Получены диастереомеры ВОС-аланилаллилглицина, ВОС-аланил- и ВОС-аланилглицил- β -(N-имидазолил)аланинов. Пептидный синтез осуществлен методом активированных эфиров.

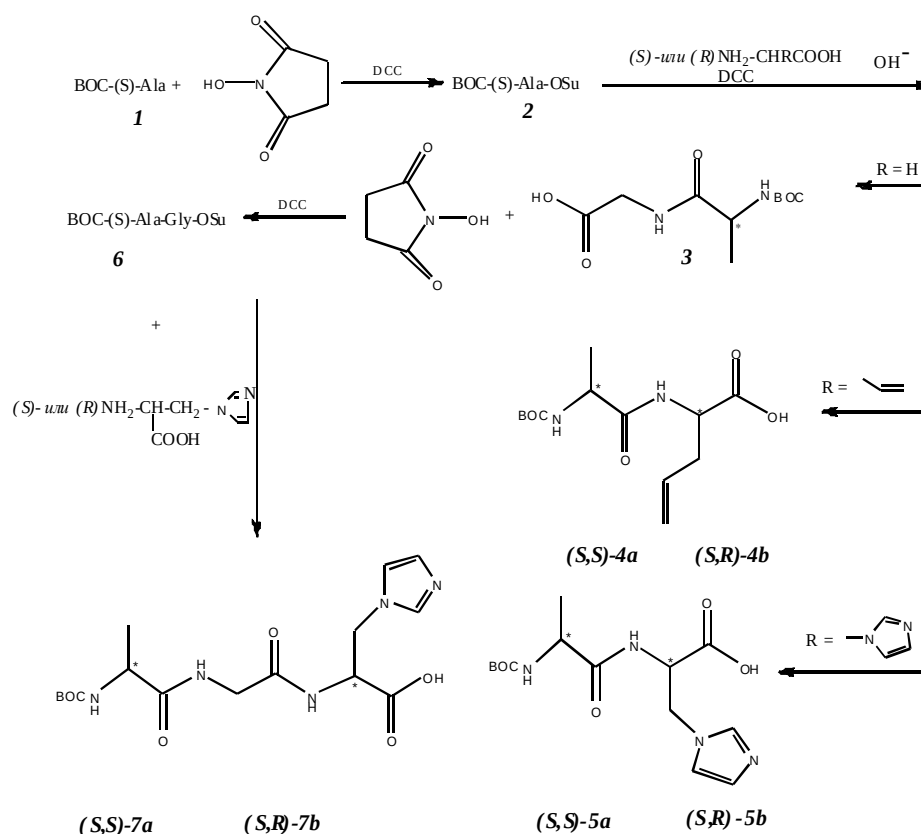
Библ. ссылок 6.

Классический пептидный синтез в растворе, как правило, отличается простотой, что при стабильности продуктов реакции позволяет с большими выходами и высокой чистотой получать желаемые препараты для любых целей. Наиболее привлекательным из многочисленных методов классического пептидного синтеза является метод активированных эфиров [1,2], применение которого позволяет сводить к минимуму процесс рацемизации. Этот подход был использован нами при синтезе новых производных ди- и трипептидов, содержащих фрагмент небелковой аминокислоты. Создание подобных пептидов может обогатить список физиологически активных субстанций (ингибиторов ферментов, радиопротекторов, антисептиков и т.д.) [3].

В качестве субстратов были использованы ВОС-(*S*)-аланин (1) и глицин, а также небелковые аминокислоты – (*S*)- и (*R*)-аллилглицины и (*S*)- и (*R*)- β -(N-имидазолил)аланины [4-6]. Последние были синтезированы в лаборатории асимметрического синтеза НИИ биотехнологии.

На первой стадии в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC) из BOC-(*S*)-аланина был получен соответствующий достаточно устойчивый активированный эфир **2**, который в щелочной водно-органической среде конденсируется с аминокислотами с образованием соответствующих дипептидов **3**, **4a**, **4b**, **5a** и **5b**.

Трипептиды BOC-(*S*)-аланилглицил-(*S*)-β-(N-имидазолил)аланин (**7a**) и BOC-(*S*)-аланилглицил-(*R*)-β-(N-имидазолил)аланин (**7b**) получены по той же схеме через активированный эфир. Для упрощения процесса в ряде случаев реакцию вели без выделения промежуточного N-оксисукцинимидного эфира.



В результате нами впервые получены производные ди- и трипептидов, содержащих небелковые аминокислоты (*S*)- и (*R*)-аллилглицины и (*S*)- и (*R*)-β-(N-имидазолил)аланины. Кроме того, при исследовании продуктов реакции методом ЯМР-спектроскопии не обнаружена рацемизация аминокислотных остатков в условиях синтеза, что позволяет предложить метод активированных эфиров для синтеза оптически чистых пептидов, содержащих небелковые аминокислоты.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H регистрировались на приборе “Varian Mercury 300VX” с рабочей частотой 300.08 МГц в растворе $\text{DMSO-}d_6/\text{CCl}_4$ 1/3 с использованием метода двойного резонанса. ТСХ проводили на пластинках “Silufol UV-254” (проявитель – хлор-толуидин). Колоночное разделение осуществляли с помощью SiO_2 L 40/100.

Реагентами при синтезе служили N,N'-дициклогексилкарбодиимид, N-оксисукцинимид, гидроокись натрия и бикарбонат натрия.

Аминокислоты – (S)- и (R)- α -аллилглицины и (S)- и (R)- β -N-имидазолилаланины, синтезированы согласно [5,6].

N-Оксисукцинимидный эфир ВОС-(S)-аланин (2). К раствору 1.5 г (7.9 ммоль) ВОС-(S)-аланина и 0.95 г (8.2 ммоль) N-гидроксисукцинимид в смеси 1.0 мл диоксана и 2.7 мл хлористого метилена при 0°C добавляли 1.75 г (8.5 ммоль) DCC, предварительно растворенного в 3 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0°C и оставляли на ночь в холодильнике. За ходом реакции следили методом ТСХ (хлороформ/этилацетат/метанол, 2:4:1). Образовавшийся осадок отфильтровывали, фильтрат концентрировали под вакуумом до выпадения осадка, который кристаллизовали из изопропилового спирта. Получили продукт **2** с выходом 70%, т.пл. 148-150°C [4].

ВОС-(S)-Аланилглицин (3). К раствору 0.08 г (1.5 ммоль) глицина в 2 мл 0.5 М NaOH добавляли 0.085 г (1 ммоль) NaHCO_3 и далее прибавляли 0.4 г (1.6 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира ВОС-(S)-аланина в 4 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали 6 ч при комнатной температуре, затем переносили в делительную воронку и добавляли 6 мл этилацетата, 3 мл 10% раствора лимонной кислоты и 0.2 г NaCl. После интенсивного перемешивания органический слой отделяли, сушили сульфатом магния и растворитель отгоняли под вакуумом при 50°C. Остаток вещества **3** кристаллизовали из смеси этилацетат петролейный эфир в соотношении 1/3. Выход 70%, т.пл. 93-95°C. Найдено, %: С 49.05; Н 7.91; N 11.92. $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, %: С 48.78; Н 7.37; N 11.38. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., Гц: 1.25 (д., 3H, $^3J=7.1$, CHCH_3); 1.42 (с., 9H, t- C_4H_9); 3.75 (д.д., 1H, $^2J=17.7$, $^3J=5.6$) и 3.78 (д.д., 1H, $^2J=17.7$, $^3J=5.6$, NCH_2); 4.06 (д.к., 1H, $^3J=7.6$, $^3J=7.1$, NCH); 6.26 (д., 1H, $^3J=7.6$, NH); 7.81 (т., 1H, $^3J=5.6$, NH); 11.3 (ш., 1H, COOH);

ВОС-(S)-Аланил-(S)-аллилглицин (4a). В плоскодонную колбу с магнитной мешалкой помещали 0.17 г (1.5 ммоль) (S)-аллилглицина, 2 мл 0.5 М раствора NaOH и 0.09 г (1.05 ммоль) NaHCO_3 . При комнатной температуре добавляли 0.38 г (1.55 ммоль) сукцинимидного эфира ВОС-(S)-аланина в 4 мл диоксана, реакционную смесь перемешивали 6 ч и оставляли на ночь. На следующий день в содержимое колбы добавляли 6 мл этилацетата и 3 мл 10% водного раствора лимонной кислоты. После интенсивного перемешивания органический слой отделяли, а водный два раза экстрагировали этилацетом (по 4 мл). Органический слой сушили безводным сульфатом натрия и растворитель упаривали в вакууме досуха. Вязкий остаток растворяли при нагревании в смеси 10 мл гексана и 3 мл этилацетата и оставляли на ночь. На следующий день реакционную смесь фильтровали, фильтрат упаривали досуха. Образовавшийся вязкий остаток

сушили в вакууме при 40-45° С. ТСХ анализ в системе хлороформ–этилацетат–метанол, 2:4:1. Выход продукта **4a** в расчете на исходный сукцинимидный эфир 70%. Найдено, %: С 55.01; Н 8.01; N 10.22. $C_{13}H_{22}N_2O_5$. Вычислено, %: С 54.54; Н 7.74; N 9.78. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д., Гц: 1.23 (д., 3H, $^3J=7.1$, CH_3); 1.42 (с., 9H, $t-C_4H_9$); 2.39 (д.т., 1H, $^2J=14.2$, $^3J=7.2$) и 2.52 (м., 1H, CH_2); 4.04 (к., 1H, $^3J=7.1$, NCH); 4.32 (т.д., 1H, $^3J=7.6$, $^3J=5.2$, NCH); 5.03 (д.к., 1H, $^3J=10.0$, $^4J=1.5$) и 5.09 (д.к., 1H, $^3J=17.0$, $^4J=1.5$, $=CH_2$); 5.74 (д.д.т., 1H, $^3J=17.0$, $^3J=10.0$, $^3J=7.0$, $=CH$); 6.29 (д., 1H, $^3J=7.8$, NH); 7.6 (д., 1H, $^3J=7.7$, NH); 10.4 (ш., 1H, COOH).

ВОС-(S)-Аланил-(R)-аллилглицин (4b). Синтез проводили аналогично синтезу (S,S)-диастереомера **4a**. Выход продукта **4b** в расчете на сукцинимидный эфир 75%. Найдено, %: С 54.88; Н 8.31; N 10.12. $C_{13}H_{22}N_2O_5$. Вычислено, % С 54.54; Н 7.74; N 9.78. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д., Гц: 1.23 (д., 3H, $^3J=7.1$, CH_3); 1.42 (с., 9H, $t-C_4H_9$); 2.39 (д.т., 1H, $^2J=14.2$, $^3J=7.4$) и 2.54 (м., 1H, CH_2); 4.05 (к., 1H, $^3J=7.1$, NCH); 4.34 (т.д., 1H, $^3J=7.8$, $^3J=5.0$, NCH); 5.03 (д.к., 1H, $^3J=10.1$, $^4J=1.5$) и 5.09 (д.к., 1H, $^3J=17.1$, $^4J=1.5$, $=CH_2$); 5.72 (д.д.т., 1H, $^3J=17.1$, $^3J=10.1$, $^3J=7.0$, $=CH$); 6.22 (д., 1H, $^3J=7.8$, NH); 7.70 (д., 1H, $^3J=7.4$, NH); 10.45 (ш., 1H, COOH).

ВОС-(S)-Аланил-(S)- β -(N-имидазолил)аланин (5a). В плоскодонную колбу с магнитной мешалкой помещали 0.15 г (1 ммоль) (S)- β -(N-имидазолил)аланина в 1 мл 0.5 М раствора NaOH и 0.04 г (0,5 ммоль) $NaHCO_3$. Затем при комнатной температуре добавляли 0.30 г (1 ммоль) сукцинимидного эфира ВОС-аланина в 4 мл диоксана и перемешивали реакционную смесь в течение 6 ч. На следующий день содержимое колбы упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл метилового спирта, добавляли этилацетат до помутнения раствора и оставляли на ночь. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали этилацетатом и высушивали при 60° С. Выход перекристаллизованного продукта **5a** в расчете на сукцинимидный эфир 65%, т.пл. 145-147° С. Найдено, %: С 51.95; Н 8.01; N 17.72. $C_{14}H_{22}N_4O_5$. Вычислено, %: С 51.53; Н 6.79; N 17.17. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д., Гц: 1.23 (д., 3H, $J=7.4$, CH_3); 1.41 (с., 9H, $t-C_4H_9$); 4.01 (д.к., 1H, $^3J_1=7.6$, $^3J=7.4$, $CHCH_3$); 4.37-4.46 (м., 3H, $CHCH_2$); 5.20 (ш., CO_2H и H_2O); 6.67 (д., 1H, $^3J=7.6$, $NHCHCH_3$); 6.88 (с., 1H, $N=CH$); 7.06 (с., 1H, $N=CH$); 7.64 (с., 1H, $N=CHN$); 7.72 (д., 1H, $^3J=5.6$, $NHCHCH_2$).

ВОС-(S)-Аланил-(R)- β -(N-имидазолил)аланин (5b). Синтез проводили аналогично синтезу ВОС-(S)-аланил-(S)- β -(N-имидазолил)аланина (**5a**). Конечный продукт выделяли перекристаллизацией из смеси метанол–этилацетат, 1:1. Выход продукта **5b** в расчете на сукцинимидный эфир 75%, т.пл. 142-144 ° С. Найдено, %: С 52.02; Н 8.21; N 17.42. $C_{14}H_{22}N_4O_5$. Вычислено, %: С 51.53; Н 6.79; N 17.17. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д., Гц: 1.22 (д., 3H, $^3J=7.4$, CH_3); 1.43 (с., 9H, $t-C_4H_9$); 4.00 (квн., 1H, $^3J=7.4$, $CHCH_3$); 4.36-4.47 (м., 3H, $CHCH_2$); 6.40 (ш., CO_2H и H_2O); 6.69 (д., 1H, $^3J=7.4$, $NHCHCH_3$); 6.90 (с., 1H, $N=CH$); 7.09 (с., 1H, $N=CH$); 7.68 (с., 1H, $N=CHN$); 7.73 (д., 1H, $J=5.5$, $NHCHCH_2$).

Сукцинимидный эфир ВОС-(S)-аланилглицин (6). Синтез осуществляли аналогично синтезу соединения **2**. После удаления хлористого метилена из реакционной смеси (предварительно отфильтрованной от мочевины) раствор сукцинимидного эфира ВОС-(S)-аланина в диоксане использовали для получения пептида.

ВОС-(S)-Аланилглицил-(S)- β -(N-имидазолил)аланин (7a). В плоскодонную колбу с магнитной мешалкой помещали 0.15 г (0.97 ммоль) (S)- β -(N-имидазолил)аланина, 1.5 мл 0.5 М

раствора NaOH и добавляли при комнатной температуре около 0.32 г (1 ммоль) сукцинимидного эфира BOC-(S)-аланилглицина в 3 мл диоксана. На следующий день реакционную смесь подкисляли 3 мл 10% водн. раствором лимонной кислоты и упаривали досуха в вакууме. Образовавшийся остаток промывали диоксаном (2x3 мл), после чего сухой остаток экстрагировали смесью метанол-этилацетат в соотношении 1/2. Экстракт упаривали досуха, вновь образовавшийся остаток промывали этилацетатом (2x1 мл). Полученный белый осадок сушили под вакуумом при 55-60°C. ТСХ анализ (хлороформ-этилацетат-метанол, 2:4:1 и бутанол-уксусная кислота-вода, 3:1:1). Выход продукта **7a** в расчете на сукцинимидный эфир 52%, т.пл. 138-140°C. Найдено, %: С 50.55; Н 7.01; N 18.72. $C_{16}H_{25}N_5O_6$. Вычислено, % С 50.13; Н 6.57; N 18.26. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д., Гц: 1.25 (д., 3H, J=7.0, CH_3); 1.41 (с., 9H, t- C_4H_9); 3.71 (д.д., 1H, $^2J=16.6$, $^3J=5.5$) и 3.77 (д.д., 1H, $^2J=16.6$, $^3J=5.8$, NCH_2CO); 4.04 (м., 1H, $\underline{CHCH_3}$); 4.35 (д.д., 1H, $^2J=14.2$, $^3J=6.7$) и 4.44 (д.д., 1H, $^2J=14.2$, $^3J=4.0$, $CHCH_2N$); 4.58 (д.д.д., 1H, $^3J=7.0$, $^3J=6.7$, $^3J=4.0$, $\underline{CHCH_2}$); 5.83 (ш., $COOH$, H_2O); 6.50 (д., 1H, $^3J=7.2$, $\underline{NHCHCH_3}$); 6.94 (с., 1H, NCH); 7.13 (с., 1H, NCH); 7.78 (с., 1H, $NCHN$); 8.02 (д., 1H, $^3J=7.0$, $\underline{NHCHCH_2}$); 8.03 (ш., 1H, $\underline{NHCH_2}$).

BOC-(S)-Аланилглицил-(R)- β -(N-имидазолил)аланин (7b). Синтез и выделение продукта проводили аналогично синтезу пептида **7a**. Выход пептида **7b** в расчете на сукцинимидный эфир 55%, т.пл. 136-138°C. Найдено, % С 50.45; Н 7.19; N 18.62. $C_{16}H_{25}N_5O_6$. Вычислено, % С 50.13; Н 6.57; N 18.26. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д., Гц: 1.24 (д., 3H, $^3J=7.0$, CH_3); 1.41 (с., 9H, t- C_4H_9); 3.74 (м., 2H, NCH_2CO); 4.03 (м., 1H, $\underline{CHCH_3}$); 4.34 (д.д., 1H, $^2J=13.5$, $^3J=6.9$) и 4.45 (д.д., 1H, $^2J=13.5$, $^3J=4.0$, $CHCH_2N$); 4.55 (т.д., 1H, $^3J=6.9$, $^3J=4.0$, $\underline{CHCH_2}$); 6.52 (д., 1H, J=7.3, $\underline{NHCHCH_3}$); 6.60 (ш., CO_2H и H_2O); 6.95 (т., 1H, J~1.1, NCH); 7.13 (т., 1H, J~1.1, NCH); 7.79 (т., 1H, J~1.1, $NCHN$); 7.98 (д., 1H, J=7.0, $\underline{NHCHCH_2}$); 8.02 (ш., 1H, $\underline{NHCH_2}$); 6,60(ш., $COOH$, H_2O).

**ՕՊՏԻԿԱԴԵՍ ԱԿՏԻՎ ՈՉ ՍՊԻՏԱԿՈՒՅԱՅԻՆ α -ԱԼԻԼԳԼԻՑԻՆ
ԵՎ β -(N-ԻՄԻԴԱԶՈԼԻԼ)ԱԼԱՆԻՆ ԱՍԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ
ԴԻ- ԵՎ ՏՐԻՊԵՊՏԻԴՆԵՐԻ ԱԾԱՆՑՑԱԼՆԵՐԻ ՄԻՆԹԵԶԸ**

**ՅՄ. Մ. ԴԱՆԴՅԱՆ, Տ. Հ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Ս. Մ. ԶԱՄԳԱՐՅԱՆ,
Է. Ա. ԳՅՈՒԼՈՒՄՅԱՆ, Հ. Ա. ՓԱՆՈՍՅԱՆ և Ա. Ս. ՍԱԴԻՅԱՆ**

Մինթեզված են դի- և տրիպեպտիդների նմանակները ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների՝ (S)- և (R)- (-ալիլզիցինների, (S)- և (R)- β - (N-իմիդազոլիլ)ալանինների պարունակությամբ: Ստացվել են BOC-ալանիլալիլզիցինի, BOC-ալանիլ- β -(N-իմիդազոլիլ)ալանինի և BOC-ալանիլզիցիլ- β -(N-իմիդազոլիլ)ալանինի դիաստերեոմերները: Պեպտիդային սինթեզը կատարվել է ակտիվացված եթերների եղանակով:

**SYNTHESIS OF DERIVATIVES OF DI- AND TRIPEPTIDES WITH INVOLVEMENT OF
OPTICALLY ACTIVE NONPROTEIN AMINO ACIDS
OF α -ALLYLGLYCINE AND β -(N-IMIDAZOLYL)ALANINE**

**Yu. M. DANGHYAN, T. H. SARGSYAN, S. M. DJAMGARYAN, E. A. GYULUMYAN,
H. A. PANOSYAN and A. S. SAGHIYAN**

Scientific Research Institute of Biotechnology
14 Gyurjan Str., 0056, Yerevan, Armenia
Fax: (374 10) 654 183 E-mail: biotech@netsys.am
Molecule Structure Research Center
26 Azatutyan Str., Yerevan, 0014, Armenia

For the first time derivatives of di- and tripeptides have been synthesized with the use of optically pure nonprotein amino acids of (*S*)- and (*R*)-allylglycine, (*S*)- and (*R*)- β -(N-imidazolyl) alanine. Diastereomers of BOC-alanylallylglycine, BOC-alanyl- β -(N-imidazolyl)alanine and BOC-alanylglycyl- β -(N-imidazolyl)alanine were obtained. The peptide synthesis was conducted by the method of activated ethers.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M.* // Ibid., 1963, v. 85, №19, p. 3039.
- [2] *Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M.* // J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, 19, p. 1839.
- [3] *Чипенс Г.И., Славинская В.А., Силе Д.Е.* // Известия АН ЛССР, 1985, т. 3, с. 259.
- [4] *Позднев В.Ф.* // Химия природных соединений, 1974, №6, с. 764.
- [5] *Saghiyan A.S., Dadayan S.A., Petrosyan S.G., Manasyan L.L., Geolchanyan A.V., Djamgaryan S.A., Andreasyan S.A., Maleev V.I., Khrustalev V.N.* // Tetrahedron Asymmetry, 2006, v. 17, p. 455.
- [6] *Belokon Yu.N., Saghiyan A.S., Djamgaryan S.A., Bakhmutov V.I., Belikov V.M.* // Tetrahedron, 1988, v. 44, №17, p. 5507.