



УДК 547.466.22

## СИНТЕЗ ОКТАДЕЦИЛОВЫХ ЭФИРОВ ГИДРОФОБНЫХ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ

© 1995 г. Ф. Х. Исхакова\*, О. В. Есипова, Е. Н. Звонкова

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 20.06.94 г. После доработки 26.01.95 г.

Разработаны схемы синтеза октадециловых эфиров гидрофобных пептидов, содержащих *L*-пролин, и получены их дейтериймеченые аналоги. С помощью  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии отмечено наличие *цис-транс*-конформеров по связи *X-Pro*.

Ключевые слова: пролин; пролинсодержащие пептиды; *цис-транс*-изомерия связи *X-Pro*; ЯМР;  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ .

Недавно было показано, что ферментативным гидролизом казеинов молока можно получить ряд биологически активных пептидов, обладающих опиоидными, иммуностимулирующими свойствами, а также способностью ингибировать ангиотензинпревращающий фермент [1 - 4]. Было обнаружено, что введение в подобные пептиды остатка высшей жирной кислоты облегчает их проникновение в мембрану и пролонгирует их действие [5 - 7].

Ранее нами были получены *N*-стеароил- и *O*-октадецилпроизводные гидрофобного пептида Gly-Leu-Phe из казеина, обладающего иммуностимулирующим действием [8], а также их дейтерированные аналоги для изучения взаимодействия с фосфолипидным бислоем методами ЯМР на ядрах  $^2\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  [9]. Наше внимание привлек фрагмент Phe-Pro-Gly из последовательности  $\beta$ -казоморфина.  $\beta$ -Казоморфин (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) – продукт ферментативного гидролиза  $\beta$ -казеина, проявляющий опиоидные эффекты *in vivo* и *in vitro*, а его *N*-концевой пентапептид имеет активность в 10 раз большую, чем сам  $\beta$ -казоморфин [2]. Совпадающая с этим фрагментом по аминокислотному составу последовательность Pro-Gly-Phe часто встречается в нативном проколлагене, а также является фрагментом нонапептидного гормона брадикинина Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg [10]. Мы решили синтезировать ряд гидрофобных пептидов, соответствующих упомянутому трипептидным фрагментам  $\beta$ -казо-

морфина и брадикинина, а также их ретропоследовательности и дейтериймеченые аналоги в виде октадециловых эфиров для изучения их свойств в модельных мембранных системах [9].

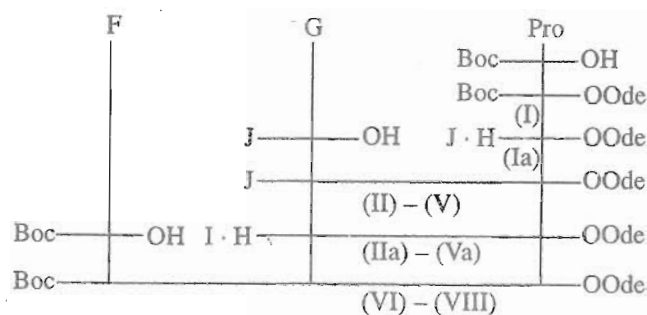
Нами были синтезированы октадециловые эфиры ди- и трипептидов, содержащие фрагменты Pro-Gly или Gly-Pro (схемы 1 и 2). Известно, что синтез, удаление защитных групп и очистка пептидов, содержащих связь Pro-Gly, обычно сопровождаются рядом побочных реакций, что ведет к снижению выхода синтезируемых соединений по сравнению с пептидами, содержащими связь Gly-Pro, в силу меньшей лабильности последних [11]. Однако использование нами октадецилового эфира в качестве постоянной защитной группы остатков Pro или Gly привело к устранению различий в синтезе этих дипептидных фрагментов (II - V, IX, X) и трипептидов на их основе (VI - VIII, XI - XIII).

Октадециловые эфиры глицина в меченом и немеченом вариантах были приготовлены прямой этерификацией 1-октадеканолом в присутствии *n*-толуолсульфонокислоты в качестве катализатора [12]. Октадециловый эфир *L*-пролина был синтезирован по методу Позднева с использованием ди-*tert*-бутилпиноксакарбоната [13]. Вос-Gly\*-ОН и Вос-*L*-Phe\*-ОН также получали с применением этого реагента [14].

На стадии синтеза дипептидов успешным оказался как метод смешанных ангидридов с помощью изобутилхлоркарбоната в присутствии *N*-метилморфолина, так и дидиклогексилкарбодиимидный метод с использованием в качестве добавки 1-гидроксибензотриазола. При синтезе Вос-Pro-Gly-OOde (IX) методом смешанных ангидридов непрореагировавший смешанный ангидрид Вос-Pro и изобутилгольной кислоты (XIV)

Сокращения: TFA – трифторуксусная кислота, НОВТ – 1-гидроксибензотриазол, ИВС – изобутилхлоркарбонат, Рас – фенол, THF – тетрагидрофуран, (M) и (m) – мажорные и минорные сигналы в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР, Gly\* – [ $\text{C}^{\alpha-2}\text{H}_2$ ]глицин, Phe\* – [ $\text{C}_6^2\text{H}_5$ ]фенилаланин, Ode – октадецил.

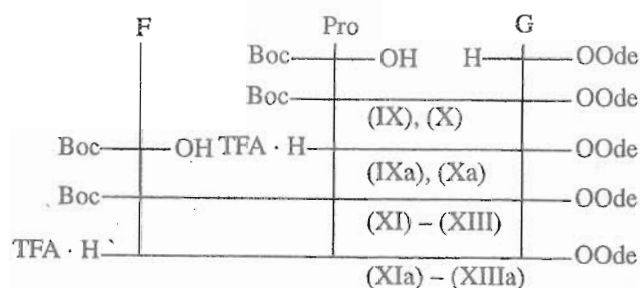
\* Автор для переписки.



Соединение	G	F	J	Метод синтеза или реагент	Выход, %
(I)	-	-	-	(Boc) <sub>2</sub> O	83
(Ia)	-	-	TFA	TFA	97
(II)	Gly	-	Z	DCC/НОВТ	85
				IBC	79
(III)	Gly*	-	Z	DCC/НОВТ	89
(IV)	Gly	-	Boc	IBC	71
(V)	Gly*	-	Boc	IBC	80
(IIa)	Gly	-	HBr	HBr/CH <sub>3</sub> COOH	84
(IIIa)	Gly*	-	HBr	»	90
(IVa)	Gly	-	TFA	TFA	98
(Va)	Gly*	-	TFA	»	97
(VI)	Gly	Phe	-	DCC/НОВТ	68
(VII)	Gly*	Phe	-	DCC/НОВТ	57
(VIII)	Gly	Phe*	-	DCC/НОВТ	45

Примечание. Звездочкой помечены дейтериймеченые остатки.

Схема 1.



Соединение	G	F	Метод синтеза или реагент	Выход, %
(IX)	Gly	-	IBC	86
(X)	Gly*	-	IBC	72.5
(IXa)	Gly	-	TFA	97
(Xa)	Gly*	-	TFA	98
(XI)	Gly	Phe	DCC/НОВТ	75
(XII)	Gly*	Phe	DCC/НОВТ	68
(XIII)	Gly	Phe*	DCC/НОВТ	59
(XIa)	Gly	Phe	TFA	95
(XIIa)	Gly*	Phe	TFA	96
(XIIIa)	Gly	Phe*	TFA	92

Примечание. Звездочкой помечены дейтериймеченые остатки.

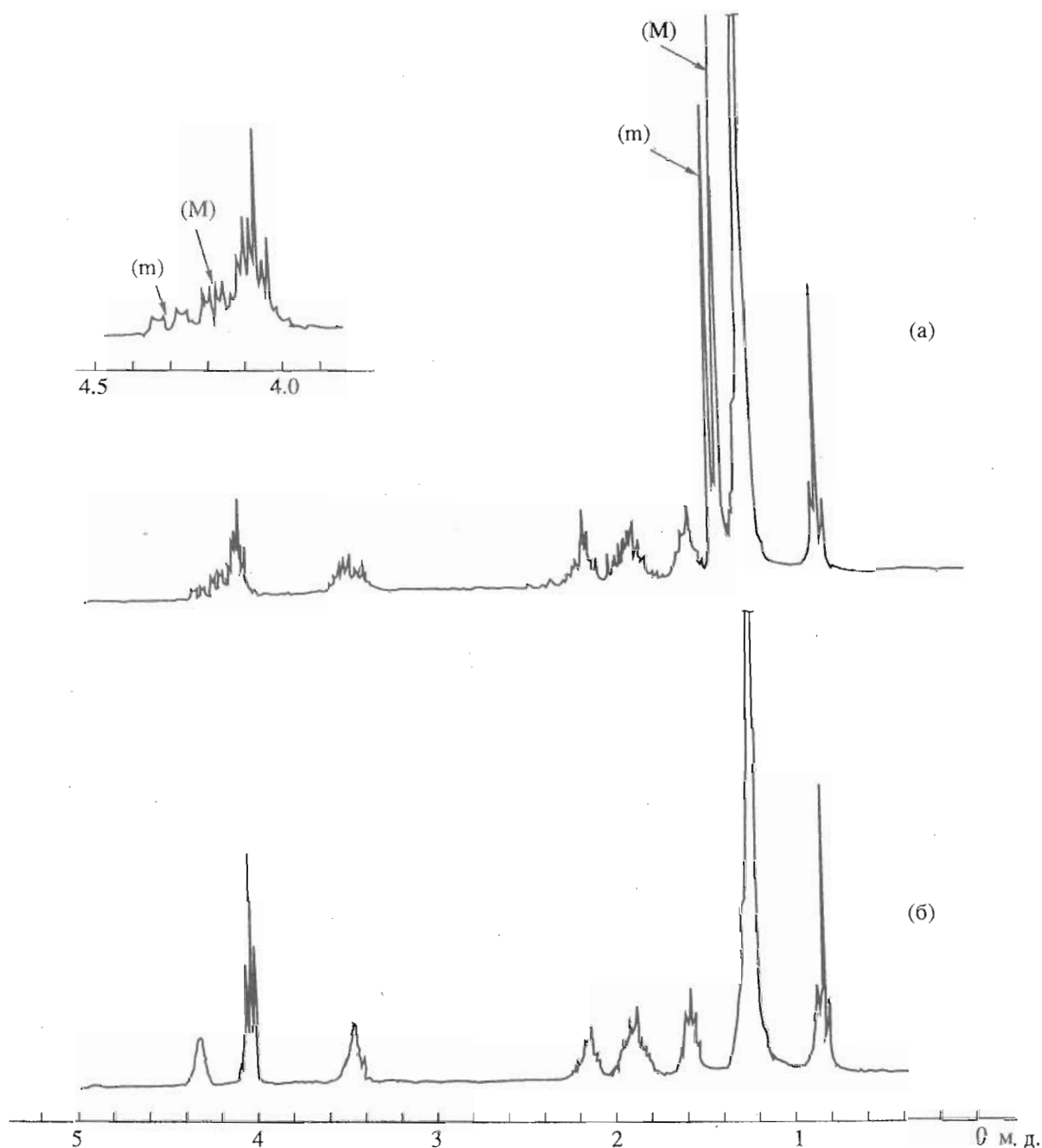
Схема 2.

был выделен и охарактеризован с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии. Несмотря на устойчивость данного смешанного ангидрида, выход соединения (IX) был достаточно высоким (86%).

Октадециловый эфир глицилпролина был синтезирован как в виде Boc- (IV, V), так и в виде Z-производных (II, III), причем Z-Gly-Pro-ODe (II) был получен методом смешанных ангидридов и карбодимидным методом. При использовании DCC/НОВТ-метода (см. схему 1) выходы были несколько более высокими и достигали 85 - 89% по сравнению с методом смешанных ангидридов (71 - 80%). Бензилоксикарбонильную защитную группу соединений (II, III) удалось снять лишь в достаточно жестких условиях (HBr в уксусной кислоте). Попытки удалить ее мягким каталитическим гидрогенолизом не увенчались успехом даже за 24 ч, хотя у Z-Gly-Pro-OMe Z-защита удалялась в подобных условиях за 30 мин. Поэтому во всех остальных случаях мы использовали трет-бутилоксикарбонильную группу, учитывая легкость удаления и более высокие выходы (например, в случае соединений (IVa) и (Va)) при обработке трифторуксусной кислотой в хлористом метиле.

На стадии получения трипептидов предпочтение было отдано DCC/НОВТ-методу. Более низкие выходы при получении Boc-Phe-Gly-Pro-ODe (VI) и его дейтериймеченых аналогов (VII, VIII) по сравнению с Boc-Phe-Pro-Gly-ODe (XI) и его аналогами (XII, XIII), вероятно, могут быть объяснены конформационными особенностями аминокон компонента: остаток пролина в H-Gly-Pro-ODe (IIa) придает молекуле свернутую конформацию и, по-видимому, делает аминогруппу глицина стерически более труднодоступной, чем иминогруппа пролина в H-Pro-Gly-ODe (IXa).

Конформационные особенности Pro-содержащих пептидов, связанные с возможностью *цис-транс*-изомеризации имидной X-Pro-связи, как известно, проявляются в спектрах <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР соответствующих производных [15 - 18]. Так, для Boc-Pro-ODe (I) мы наблюдали два синглетных сигнала (мажорный (M) и минорный (m)) протонов Boc-группы в области 1.40 и 1.45 м. д. соответственно с соотношением интегральных интенсивностей 3 : 2 (10 - 50 мг/мл, CDCl<sub>3</sub>). Сигналы α-CH<sub>2</sub> алкильной цепи и α-CH остатка Pro имели характер сложных мультиплетов при 4.1 и 4.25 м. д. соответственно, которые после удаления Boc-защиты упрощались до хорошо разрешенного триплета α-CH<sub>2</sub> алкильной цепи при 4.2 м. д. и уширенного сигнала α-CH остатка-Pro при 4.43 м. д. (см. рисунок). Этот результат можно объяснить отсутствием возможностей *цис-транс*-изомеризации для деблокированного эфира, что соответствует данным, приведенным в литературе для



<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры Vos-Pro-OODE (а) и n-Pro-OODE (б) в CDCl<sub>3</sub> + гексаметилдисилоксан.

других эфиров Vos-Pro-OR, например фенациловых (R = CH<sub>2</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) [15].

Наиболее выраженные различия *цис-транс*-изомеров X-Pro наблюдаются по химическим сдвигам β- и γ-углеродных атомов пирролидинового кольца в <sup>13</sup>C-ЯМР-спектре: сигнал β-CH<sub>2</sub>-атома *цис*-изомера смещен на 0.5 - 1.8 м. д. в сторону более слабого поля по сравнению с сигналом *транс*-изомера. Наоборот, сигнал γ-CH<sub>2</sub>-атома *цис*-изомера смещен в сторону более сильного поля по сравнению с соответствующим сигналом *транс*-изомера [18].

В <sup>13</sup>C-ЯМР-спектре Vos-Pro-OODE (I) мы наблюдали сигналы в области 24.70 и 30.41 м. д. для *транс*-конформера и сигналы 24.02 и 31.37 м. д. для *цис*-конформера. Любопытно, что *цис*-конформер Vos-Pro-OODE явно преобладает над *транс*-конформером в условиях съемки спектра <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 50 мг/мл), тогда как, например, для Vos-Pro-ORac авторы работы [15] наблюдали доминирование *транс*-конформера в тех же условиях съемки спектра. Наши расчеты различных конформаций молекулы Vos-Pro-OODE с помощью программы для персонального компьютера

Характеристические мажорные (M) и минорные (m) сигналы ( $\delta$ , м. д.) в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах *цис-транс*-конформеров пептидов,\* содержащих связь X-Pro

Номер соединения	Соединение	$(\text{CH}_3)_3\text{COCO}-$	$\alpha\text{CH Pro}$	Соотношение интенсивностей мажорного и минорного сигналов M : m
(I)	Вос-Pro-OOde	1.40 (M) 1.45 (m)	4.18 дд (M) 4.30 дд (m)	3 : 2
(IX)	Вос-Pro-Gly-OOde	1.45	4.3 ушир.	—
(XIV)	Вос-Pro-OCOObu <sup>l</sup>	1.41 (M) 1.43 (m)	4.27 к (M) 4.36 к (m)	4 : 1
(IV)	Вос-Gly-Pro-OOde	1.40 (m) 1.43 (M)	4.35 дд (m) 4.50 дд (M)	4 : 1
(II)	Z-Gly-Pro-OOde	—	4.35 дд (m) 4.50 дд (M)	9 : 1
(XI)	Вос-Phe-Pro-Gly-OOde	1.37 (m) 1.40 (M)	4.65 м	4 : 1
(VI)	Вос-Phe-Gly-Pro-OOde (10 мг/мл) (70 мг/мл)	1.36 (M) 1.37 (m) 1.34	4.95 м ушир. 5.0 м	9 : 1 —

\* Соответствующие дейтериймеченые соединения (III, V, VII, VIII, X, XII, XIII) имели те же спектральные характеристики.

PC MODEL (версия PI 3.2, Serena Software, PO Box 3076, Bloomington, IN, USA) также подтвердили, что в среде с диэлектрической проницаемостью хлороформа ( $\epsilon$  5.1) энергетически более выгоден *цис*-конформер. Вероятно, именно остаток высшего алифатического спирта в виде октадецилового эфира так заметно влияет на сдвиг подвижного *цис-транс*-равновесия в сторону *цис*-конфигурации имидной связи X-Pro.

Интересно, что в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре Вос-Pro-Gly-OOde (IX) мы наблюдали только один синглет протонов Вос-группы в области 1.45 м. д., что свидетельствует о присутствии лишь одного конформера. Согласно данным [15], Вос-Pro-Phe-OPac и Вос-Pro-Phe-OPac также существуют в одной конформационной форме в условиях съемки спектров ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , с 10 мг/мл, 30°C).

Аналогичный характер имели спектры синтезированных нами ди- и трипептидов (II - V, VI - VIII, XI - XIII) (см. таблицу). На соотношение образующихся *цис-транс*-конформеров, как следует из данных [11, 15, 19], влияет множество различных факторов. Так, при увеличении концентрации Вос-Phe-Gly-Pro-OOde (VI) и его дейтериймеченых аналогов (VII, VIII) в  $\text{CDCl}_3$  от 10 до 70 мг/мл мы обнаружили исчезновение в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР всех минорных сигналов (m), которые вновь появлялись при разбавлении образца.

При исследовании дейтерированных аналогов октадециловых эфиров ди- и трипептидов в фосфолипидном бислое методом  $^2\text{H}$ -ЯМР по отработанной нами ранее методике [9] мы наблюдали по одному квадрупольному расщеплению со значениями 19.5 и 15.1 кГц для  $\text{NBg} \cdot \text{Gly}^* \cdot \text{Pro-OOde}$  (IIa) и  $\text{TFA} \cdot \text{Pro-Gly}^* \cdot \text{OOde}$  (IIa) соответственно и два квадрупольных расщепления для  $\text{TFA} \cdot \text{Phe-Pro}$

$\text{Gly}^* \cdot \text{OOde}$  (IIa) со значениями 14.1 и 2.6 кГц. Но однозначно сказать, связано ли это с неэквивалентностью дейтеронов  $\text{Gly}^*$  или с наличием *цис-транс*-изомеров Pro-содержащих пептидов в фосфолипидном бислое, на данном этапе исследований еще нельзя. По завершении исследований синтезированных нами пептидов в модельных фосфолипидных бислоях методами  $^2\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР результаты будут опубликованы в отдельной статье.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные аминокислот L-ряда фирмы Reanal (Венгрия), [ $\text{C}^{13}$ - $^2\text{H}_2$ ]глицин, стеариновую кислоту, *n*-толуолсульфокислоту, трифторуксусную кислоту, яичный фосфатидилхолин отечественного производства, N-гидросукцинимид, изобутилхлоркарбонат, дициклогексилкарбодимид, N,N-диметиламинопиридин, дитрет-бутилпирокарбонат (Fluka, Швейцария), 1-гидроксibenзотриазол, N-метилморфолин (Aldrich, США). Дейтерированный L-[ $\text{C}_6^2\text{H}_5$ ]фенилаланин получали по методике [20]. Степень дейтерирования 80%.

Ход реакций и гомогенность веществ контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol (ЧСФР); использовали следующие системы растворителей: бензол-уксусная кислота, 7 : 3 (А); хлороформ-ацетон-метанол, 8 : 1 : 1 (Б); хлороформ-ацетон-метанол, 18 : 1 : 1 (В); эфир-гексан, 1 : 3 (Г); эфир-гексан, 1 : 1 (Д). Для обнаружения веществ на хроматограммах применяли опрыскивание 0.5% раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием (аминокислотные и пептидные производные); прокалывание при 250 - 300°C (высшие алифатические производные).

Для адсорбционной колоночной хроматографии использовали силикагель L 40/100 и элюирование хлороформом.

Температуру плавления определяли на приборе Voëtius (ФРГ), углы оптического вращения – на спектрополяриметре Perkin-Elmer 241 MC (Великобритания). Элементный анализ выполняли на автоматическом анализаторе "Heraeus CHNO-Rapid" (ФРГ). Расхождения между экспериментальными и расчетными данными по С, Н, N для всех синтезированных соединений находились в допустимых пределах. <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры растворов пептидов в CDCl<sub>3</sub>, <sup>31</sup>P- и <sup>2</sup>H-ЯМР-спектры пептидов в гидратированных дисперсиях фосфатидилхолина записывали на импульсном фурье-спектрометре Bruker MSL-200 (ФРГ) с рабочими частотами 200.13, 75.5, 80.9 и 30.7 МГц соответственно при 30°C. В качестве внутреннего стандарта использовали гексаметилдисилоксан.

ВЭЖХ осуществляли на хроматографе фирмы Кнауер (ФРГ), в препаративном варианте – на колонке (16 × 150 мм) Lichrospher 100 RP-18 (5 мкм, Кнауер, ФРГ), в аналитическом – на колонке (3.3 × 150 мм) Lichrospher 100 RP-18 (5 мкм, Кнауер, ФРГ). Режим градиентного элюирования: от 65% системы Ж в системе Е до 80% системы Ж в системе Е за 20 мин, где Е – 40% (по объему) воды в метаноле; Ж – 50% (по объему) хлороформа в метаноле. Скорость потока 5 мл/мин, детектирование при длине волны 254 нм.

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонилпролина (I).** К раствору 430 мг (2 ммоль) Вос-пролина и 594 мг (2.2 ммоль) октадеканола в 8 мл хлороформа приливали 81 мкл (1 ммоль) пиридина, а затем добавляли 485 мг (2.2 ммоль) ди-трет-бутилпирокарбоната и 25 мг (0.2 ммоль) 4-диметиламинопиридина. Перемешивали 4 ч при 20°C. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 15 мл этилацетата и промывали 10% лимонной кислотой (10 мл), водой, 5% раствором NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 мл), водой до pH 7. Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. После выделения методом колоночной хроматографии получали 772 мг вещества (83%). R<sub>f</sub> 0.84 (Б), 0.44 (Г). Т. пл. 28 - 29°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -27° (с 1, хлороформ). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.87 (3H, т, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (30H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-), 1.40 (9H, с(М), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.45 (9H, с(м), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.65 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.68 - 2.05 (3H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 2.05 - 2.30 (1H, м, βCH<sub>2</sub> Pro), 3.25 - 3.65 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 4.05 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 4.18 (1H, дд(М), αCH Pro), 4.30 (1H, дд(м), αCH Pro) ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-). <sup>13</sup>C-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 14.46 (CH<sub>3</sub>-), 23.09 (-CH<sub>2</sub>-), 24.02, 24.70 (γCH<sub>2</sub> Pro), 26.21, 26.32 (-CH<sub>2</sub>-), 28.82, 29.13 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-), 29.66, 29.76, 29.92, 30.12 (-CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-), 30.41, 31.37 (βCH<sub>2</sub> Pro), 32.35 (-CH<sub>2</sub>-), 33.30 (-CH<sub>2</sub>-), 46.78

(δCH<sub>2</sub> Pro), 59.45, 59.70 (αCH Pro), 65.47 (-OCH<sub>2</sub>-), 80.16 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-), 154.18 (O-C=O), 172.46 (-COO-).

**Трифторацетат октадецилового эфира пролина (Ia)** получали из 700 мг соединения (I) обработкой 50% трифторуксусной кислотой в хлористом метиле в течение 30 мин с последующим упариванием и осаждением из эфира. Выход 697 мг (97%).

**Октадециловый эфир N-бензилоксикарбонил[С<sup>α-2</sup>H<sub>2</sub>]глицилпролина (III).** К охлажденному до -5°C раствору 80 мг (0.33 ммоль) Z-(C<sup>α-2</sup>H<sub>2</sub>)Gly в тетрагидрофуране добавляли 83 мг (0.4 ммоль) DCC и 90 мг (0.66 ммоль) НОВТ. Через 30 мин добавляли 190 мг (0.4 ммоль) соединения (Ia) и 44 мкл (0.4 ммоль) N-метилморфолина. Реакционную массу перемешивали 2 ч при 0°C и 10 ч при 20°C, затем растворитель упаривали, к сухому остатку добавляли этилацетат (10 мл), отфильтровывали дициклогексилмочевину. Органическую фазу промывали 10% лимонной кислотой (2 × 5 мл), водой, 10% раствором NaHCO<sub>3</sub> (3 × 5 мл), водой до pH 7, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. После выделения методом колоночной хроматографии получено 164 мг (89%) соединения (III). R<sub>f</sub> 0.69 (Б), 0.82 (Д). Т. пл. 47 - 48°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -38.5° (с 1, хлороформ). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.85 (3H, т, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (30H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-), 1.65 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.80 - 2.17 (4H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 3.45 - 3.65 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 4.05 - 4.15 (2H, т, -CH<sub>2</sub>-), 4.35 (1H, дд(м), αCH Pro), 4.50 (1H, дд(М), αCH Pro), 5.10 (2H, с, -CH<sub>2</sub>OCO-), 5.70 (1H, с, -NH-), 7.35 (5H, м, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-).

**Бромгидрат октадецилового эфира [С<sup>α-2</sup>H<sub>2</sub>]глицилпролина (IIIa)** был получен обработкой 80 мг (0.14 ммоль) соединения (III) 2 н. НВг в уксусной кислоте (2 мл) с последующим осаждением из эфира. Выход 65 мг (90%). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -54° (с 1, хлороформ).

**Октадециловый эфир N-бензилоксикарбонилглицилпролина (II) и бромгидрат октадецилового эфира глицилпролина (IIa)** были получены аналогично соединениям (III) и (IIIa). Выходы приведены в схеме 1.

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонилглицилпролина (IV)** был получен методом смешанных ангидридов из 222 мг (1.27 ммоль) Вос-Gly, 510 мг (1.06 ммоль) TFA · H-Pro-Ode (Ia), 165 мкл (1.27 ммоль) ИВС и 257 мкл (2.31 ммоль) N-метилморфолина. После стандартной обработки реакционной массы (см. методику получения соединения (III)) и перекристаллизации из гексана выход соединения (IV) составил 398 мг (71%). R<sub>f</sub> 0.74 (Б), 0.46 (В). Т. пл. 65 - 66°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -41° (с 1, хлороформ). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.87 (3H, т,

CH<sub>3</sub>-), 1.25 (30H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-), 1.40 (9H, с(m), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.43 (9H, с(M), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.60 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.87 - 2.25 (4H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 3.35 - 3.68 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 3.93 (2H, м, αCH<sub>2</sub> Gly), 4.10 (2H, т, -CH<sub>2</sub>-), 4.35 (1H, дд(m), αCH Pro), 4.50 (1H, дд(M), αCH Pro), 5.40 (1H, м, -NH-).

**Трифторацетат октадецилового эфира глицилпролина (IVa)** был получен из 350 мг (0.67 ммоль) соединения (IV) по методике, описанной для трифторацетата (Ia). Выход 351 мг (98%).

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил[С<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицилпролина (V) и трифторацетат октадецилового эфира [С<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицилпролина (Va)** были получены аналогично соединениям (IV) и (IVa) соответственно. Выходы приведены в схеме 1.

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонилпролил[С<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицина (X).** К раствору 250 мг (0.5 ммоль) *n*-толуолсульфоната [С<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]Gly-OOde в смеси 1 мл DMF и 1.5 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> добавляли 55 мкл (0.5 ммоль) N-метилморфолина и охлаждали до 0°C (раствор аминок компонента). К охлажденному до -5°C раствору 118 мг (0.55 ммоль) Вос-Pro в 1.5 мл DMF добавляли 60 мкл (0.55 ммоль) N-метилморфолина и 71 мкл (0.55 ммоль) ИВС и через 15 мин раствор аминок компонента. Перемешивали 3 ч при -5°C, затем 8 ч при 20°C. Хлористый метилен упаривали, оставшуюся реакционную смесь в DMF экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл) после добавления 5 мл насыщенного раствора NaCl. После стандартной обработки органической фазы (см. методику получения соединения (III)) и выделения методом колоночной хроматографии получали следующие соединения:

(X) 190 мг (73%). Т. пл. 57 - 59°C, R<sub>f</sub> 0.83 (A), 0.51 (B). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -46° (с 1, хлороформ). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.87 (3H, т, CH<sub>3</sub>-), 1.30 (30H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-), 1.45 (9H, с, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.65 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.80 - 2.00 (4H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 3.20 - 3.55 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 4.10 - 4.25 (2H, т, -CH<sub>2</sub>-), 4.25 - 4.45 (1H, м, αCH Pro), 6.45 - 6.60 (1H, м, -NH-).

(XIV) 34 мг. R<sub>f</sub> 0.92 (B). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.94 (6H, дд, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-), 1.22 (1H, м, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-), 1.41 (9H, с(M), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.43 (9H, с(m), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.85 - 2.35 (4H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 3.30 - 3.62 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 3.98 - 4.06 (2H, дд, -CHNCH<sub>2</sub>-), 4.22 - 4.32 (1H, к(M), αCH Pro), 4.32 - 4.41 (1H, к(m), αCH Pro).

**Трифторацетат октадецилового эфира пролил[С<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицина (Xa)** был получен из 120 мг (0.23 ммоль) соединения (X) по методике, описанной для трифторацетата (Ia). Выход 117 мг (95%). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +13.2° (с 1, хлороформ).

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонилпролилглицина (IX) и трифторацетат октадецилового эфира пролилглицина (IXa)** получали аналогично соединениям (X) и (Xa) соответственно. Выходы приведены в схеме 2.

**Полностью защищенные производные трипептидов (VI - VIII, XI - XIII)** получали с помощью DCC/НОВТ-метода по следующей общей методике: к раствору 0.27 ммоль карбоксильного компонента в THF добавляли 0.33 ммоль DCC и 0.46 ммоль НОВТ при -5°C, через 30 мин добавляли 0.23 ммоль N-метилморфолина и 0.23 ммоль трифторацетата аминок компонента. Реакционную массу перемешивали 30 мин при 0°C и 48 ч при 20°C, затем удаляли THF, разбавляли этилацетатом (10 мл), отфильтровывали дициклогексилмочевину. Фильтрат промывали 5% раствором NaHCO<sub>3</sub> (3 × 5 мл), водой, 10% раствором лимонной кислоты (3 × 5 мл), насыщенным раствором NaCl, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали. Вещество выделяли с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ.

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонилфенилаланил-глицилпролина (VI).** Выход 104 мг (68%). R<sub>f</sub> 0.76 (B), 0.52 (B). Т. пл. 64 - 65°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -31° (с 1, хлороформ). ВЭЖХ, время удерживания 11 мин. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.85 (3H, т, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (30H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-), 1.36 (9H, с(M), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.37 (9H, с(m), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.60 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.90 - 2.30 (4H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 2.90 - 3.20 (2H, м, βCH<sub>2</sub> Phe), 3.38 - 3.64 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 3.95 (2H, м, CH<sub>2</sub> Gly), 4.10 (2H, т, -CH<sub>2</sub>-), 4.33 - 4.52 (1H, м, αCH Phe и αCH Pro), 4.88 (1H, д, NH Phe), 6.77 (1H, т(m), NH Gly), 6.84 (1H, т(M), NH Gly), 7.30 (5H, м, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-).

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонилфенилаланил[С<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицилпролина (VII).** Выход 88 мг (57%). R<sub>f</sub> 0.76 (B), 0.52 (B). Т. пл. 64 - 65.5°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -31° (с 1, хлороформ). ВЭЖХ, время удерживания 11.6 мин.

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил[С<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]фенилаланил-глицилпролина (VIII).** Выход 70 мг (45%). R<sub>f</sub> 0.76 (B), 0.52 (B). Т. пл. 65.5 - 67°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -31° (с 1, хлороформ). ВЭЖХ, время удерживания 11.9 мин.

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонилфенилаланил-пролилглицина (XI).** Выход 115 мг (75%). R<sub>f</sub> 0.76 (B), 0.52 (B). Т. пл. 88 - 89°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -32.5° (с 1, хлороформ). ВЭЖХ, время удерживания 11.2 мин. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.87 (3H, т, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (30H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-), 1.38 (9H, с(m), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.41 (9H, с(M), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-), 1.65 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.80 - 2.30 (4H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 3.0 (2H, м, βCH<sub>2</sub> Phe), 3.55 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 3.90

(2H, м, CH<sub>2</sub> Gly), 4.15 (2H, т, -CH<sub>2</sub>-), 4.65 (2H, м, αCH Phe и αCH Pro), 5.10<sup>\*</sup> (1H, д(м), NH Phe), 5.28 (1H, д(М), NH Phe), 6.98 (1H, т(М), NH Gly), 7.30 (5H, м, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-), 7.75 (1H, т(м), NH Gly).

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонилфенилаланил-пролил[С<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицина (XII).** Выход 105 мг (68%). R<sub>f</sub> 0.76 (Б), 0.52 (В). Т. пл. 89 - 90°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -32.5° (с 1, хлороформ). ВЭЖХ, время удерживания 11.5 мин.

**Октадециловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил[С<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]фенилаланил-пролил-глицина (XIII).** Выход 92 мг (59%). R<sub>f</sub> 0.76 (Б), 0.52 (В). Т. пл. 87.5 - 89°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -32.5° (с 1, хлороформ). ВЭЖХ, время удерживания 12 мин.

**Приготовление образцов для исследования взаимодействий гидрофобных пептидов с фосфолипидным бислоем методом ЯМР на ядрах <sup>2</sup>H и <sup>31</sup>P.** К 10 мг пептида добавляли раствор лецитина в хлороформе с концентрацией 100 мг/мл в количестве, необходимом для получения соотношения липид/пептид 10 : 1, растворяли. Растворитель удаляли на роторном испарителе, остаток сушили при остаточном давлении 0.5 мм рт. ст. К высушенному остатку добавляли 1 мл 0.05 М трис-НСI-буфера (рН 7.4) и встряхивали до образования гомогенной массы, которую количественно переносили в ампулу для съемки спектров ЯМР (диаметр 10 мм).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kohmura M., Nio N., Ariyoshi Y. // Peptide Chemistry 1987. Proc. 25th. Japan Symp. on Peptide Chemistry / Eds T. Shiba, Sh. Sakakibara. Osaka: Protein Research Found., 1988. P. 325 - 328.
2. Lottspeich F., Henschen A., Brantl V. // Z. Physiol. Chem. 1980. V. 361. № 12. S. 1835 - 1839.
3. Янковский О.Ю. // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1985. Т. 21. № 1. С. 62 - 68.
4. Marshall G.R., Nelson R.D. // Peptide Chemistry 1985. Proc. 23rd. Japan Symp. on Peptide Chemistry / Eds T. Shiba, Sh. Sakakibara. Osaka: Protein Research Found., 1986. P. 239 - 244.
5. Prass W., Ringsdorf H., Bessler W., Wiesmuller K., Yung G. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 900. № 1. P. 116 - 128.
6. Linther K. // Fr. Demand Fr 2.668.365 (1990). С.А. 1993. V. 118. 11510x.
7. Boutillon Chr., Martinon F., Segheraert Chr., Magne R., Tartar A. // Eur. Pat. Appl. EP 491.628 (1990). С.А. 1992. V. 117. 249893d.
8. Есипова О.В., Еремин С.В., Звонкова Е.Н. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1077 - 1085.
9. Дубовский П.В., Есипова О.В., Василенко И.А., Звонкова Е.Н. // Биол. мембраны. 1992. Т. 9. № 2. С. 184 - 192.
10. Brahmachari K. Samir, Bhat T.N., Sudhakar V., Viyayan M., Rapaka R.S., Bhatnagar R.S., Ananthanarayanan V.S. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 7. P. 1703 - 1708.
11. Шредер Э., Любке К. Пептиды. М.: Мир, 1967. С. 202 - 203.
12. Звонкова Е.Н., Хабарова Е.И., Есипова О.В., Канарова Т.И. // Журн. орган. химии. 1988. Т. 58. Вып. 10. С. 2392 - 2396.
13. Поздnev В.Ф. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 7. С. 912 - 920.
14. Поздnev В.Ф. // Химия природ. соедин. 1974. № 6. С. 764 - 767.
15. Hondrelis J., Lonergan G., Voliotis S., Matsoukas J. // Tetrahedron. 1990. V. 46. № 2. P. 565 - 576.
16. Luthman K., Hacksell U. // Acta chem. scand. 1993. V. 47. № 5. P. 461 - 468.
17. Dugas H., Laroch M., Ptak M. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1993. V. 41. № 6. P. 595 - 605.
18. Bremer J., Mendez G.L. // Austral. J. Chem. 1989. V. 42. № 7. P. 1011 - 1028.
19. Ananthanarayanan V.S., Cameron T.S. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1988. V. 31. № 2. P. 399 - 411.
20. Mattews H.R., Mattews K.S., Opella S.J. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 497. № 1. P. 1 - 13.

## Synthesis of Octadecyl Esters of Hydrophobic Proline-Containing Peptides

F. Kh. Iskhakova\*, O. V. Esipova, and E. N. Zvonkova

Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

**Abstract** – Schemes of synthesis of octadecyl esters of hydrophobic peptides containing L-proline residue and their deuterated analogs were developed. *cis-trans*-Conformers around the X-Pro peptide bond were detected by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR.

**Key words:** proline, proline-containing peptides, *cis-trans*-isomerism of X-Pro bond, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR.

\* To whom correspondence should be addressed.