



УДК 547.466.22

## СИНТЕЗ СТЕАРОИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОФОБНЫХ ПЕПТИДОВ

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

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

Поступила в редакцию 12.09.94 г.

Синтезированы стеароильные производные гидрофобных пролинсодержащих ди- и трипептидов и их дейтериймеченые аналоги. На основании данных ЯМР показано, что происходит сдвиг *цис-транс*-равновесия по связи X-Pro (X – ацильный или аминокислотный остаток) в пользу *транс*-конформеров для соединений, содержащих в структуре фрагмент Ste-Pro, в отличие от соединений, где X – Вос-группа или остаток глицина.

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

Продолжая наши исследования по изучению поведения коротких гидрофобных пептидов, содержащих аминокислотные остатки Gly, Leu, Ala, Phe, Tyr, в фосфолипидных модельных мембранах методами ЯМР широких линий [1 - 3], мы также обратили внимание на пептиды, содержащие остаток L-пролина. Короткие пролинсодержащие пептиды постоянно привлекают внимание исследователей в качестве инструментов для изучения взаимосвязи “структура–функция”. Две особенности пролина определяют его функциональную роль в пептидах и белках: пирролидиновое кольцо и способность имидной связи X-Pro существовать как в *транс*-, так и в *цис*-конфигурации [4]. Скорость *цис-транс*-изомеризации вокруг пролиновой имидной связи X-Pro зависит от полярности окружения, влияет на кинетику сворачивания глобулярных белков и формирования третичной структуры, лежит в основе биологического действия ряда пептидов и белков [4 - 8].

Ранее мы уже писали о синтезе октадециловых эфиров пролинсодержащих пептидов N-Phe-Pro-Gly-Ode и N-Phe-Gly-Pro-Ode и их дейтериймеченых аналогов [9]. Аминокислотная последовательность первого из них соответствует фрагменту  $\beta$ -казоморфина. Пептидная часть другого – ретропоследовательность фрагмента брадикинина (Pro-Gly-Phe). Данная работа посвящена синтезу стеароильных производных трипептидов Pro-Gly-Phe и Gly-Pro-Phe, являющихся полными ретропоследовательностями

вышеназванных октадециловых эфиров, а также их дейтериймеченых аналогов.

Синтез осуществлялся по приведенным ниже схемам. Полностью защищенные дипептиды были синтезированы DCC/NOBT-методом (схемы 1 и 2). Метод смешанных ангидридов оказался неприемлемым, так как Ste-Gly-OH и особенно Ste-Pro-OH образуют нереакционноспособные смешанные ангидриды с изобутилугольной кислотой. Ste-Gly-Pro и его  $^2\text{H}$ -меченый аналог Ste-Gly\*-Pro были синтезированы в виде метиловых эфиров с выходом до 46%. Ранее [10] было установлено, что при омылении метилового эфира Z-Pro-Gly-OCH<sub>3</sub> связь Pro-Gly почти полностью гидролизуеться, а в случае Z-Gly-Pro-OCH<sub>3</sub> потери, вызванные гидролизом этой связи, достигают 30%. В нашем случае при замене Z-защитной группы на стеароильную омыление метилового эфира также сопровождалось гидролизом связи Gly-Pro и выход составил 69%. В связи с этим Ste-Pro-Gly был синтезирован в виде *трет*-бутилового эфира (IV). Даже в этом случае при увеличении времени реакции мы наблюдали частичный гидролиз связи Pro-Gly, несмотря на то что реакция проводилась в значительно более мягких условиях отщепления *трет*-бутилового эфира в присутствии трифторуксусной кислоты по сравнению с условиями отщепления метилового эфира.

Для синтеза Ste-Pro-Gly\*-OH (VII\*) и Ste-Pro-Gly-OH (VII) мы воспользовались альтернативным путем, который заключался в присоединении стеароильного остатка с помощью N-гидроксисукцинимидного эфира стеариновой кислоты к дипептидам (VI\*) и (VI) (схема 3). Незащищенные дипептиды (VI, VI\*) получали путем удаления

Принятые сокращения: Ste – стеароил, Gly\* – [C $^{\alpha}$ - $^2\text{H}_2$ ]глицин, IBC – изобутилхлоркарбонат, THF – тетрагидрофуран, TFA – трифторуксусная кислота, (M) и (m) – мажорные и минорные сигналы в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР, Ode – октадецил.

\* Автор для переписки.

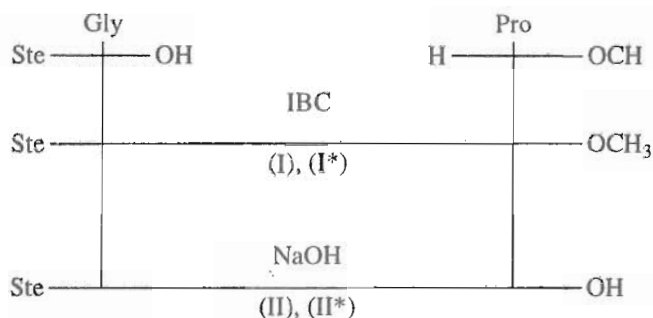


Схема 1. Синтез стеароильных производных дипептидов Gly-Pro.

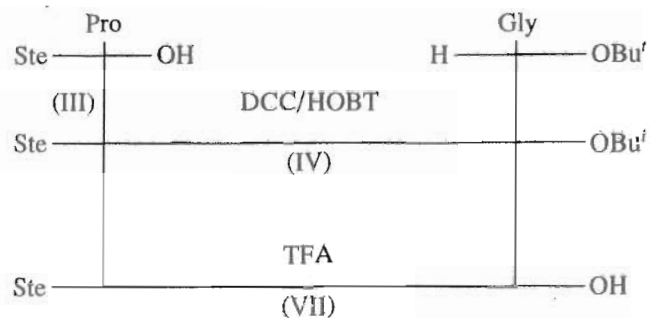


Схема 2. Синтез стеароильных производных дипептидов Pro-Gly.

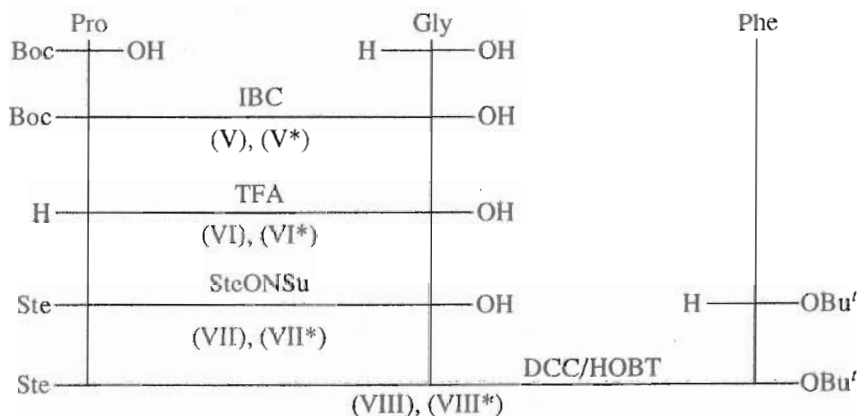


Схема 3. Синтез стеароильных производных трипептидов, содержащих фрагмент Pro-Gly.

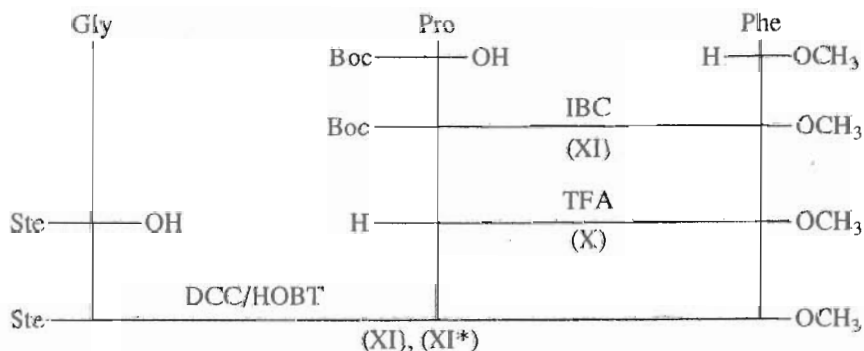


Схема 4. Синтез стеароильных производных трипептидов, содержащих фрагмент Gly-Pro.

Примечание. Звездочкой отмечены соединения, содержащие  $[C^{\alpha-2}H_2]$ глицин.

Вос-защитной группы с пептидов (V) и (V\*), синтезированных методом смешанных ангидридов. При очистке Ste-Pro-Gly-OH (VII) и Ste-Pro-Gly\*-OH (VII\*) ни перекристаллизация, ни адсорбционная колоночная хроматография на силикагеле не позволили добиться высокой степени чистоты пептидов при удовлетворительном выходе. Проблему удалось решить, используя ВЭЖХ на обращенной фазе с элюированием метанолом и рефрактометрическим детектированием, так как соединения (VII) и (VII\*) не поглощают в УФ-области.

При синтезе трипептидов мы вновь обратились к DCC/HOBT-методу (схемы 3 и 4). Ste-Pro-Gly-Phe-OBu' (VIII) и Ste-Pro-Gly\*-Phe-OBu' (VIII\*) были синтезированы по схеме 2 + 1 с выходами 73 и 75% соответственно. При синтезе Ste-Gly-Pro-Phe-OCH<sub>3</sub> (XI) и Ste-Gly\*-Pro-Phe-OCH<sub>3</sub> (XI\*) мы воспользовались схемой 1 + 2. В отличие от достаточно высоких выходов при создании связи Gly-Phe в синтезе трипептидов (VIII) и (VIII\*) выход при создании связи Gly-Pro при синтезе (XI) и (XI\*) достигал лишь 24%.

Таким образом, при синтезе стеарионных производных связь Gly-Pro образуется труднее и с меньшими выходами, чем пептидная связь Pro-Gly, которая синтезируется легче, но настолько лабильна, что гидролизует даже в процессе перекристаллизации или проведения адсорбционной колоночной хроматографии.

Метод  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии в применении к стеарионным производным пептидов пролина позволил наблюдать существование в неполярном растворителе  $\text{CDCl}_3$  двух конформеров по X-Pro-связи. Если в растворе присутствуют оба конформера, то сигнал  $\alpha$ -СН-протона пролина в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре всегда представляет собой совокупность мажорного и минорного мультиплетов [11]. Иногда интенсивность минорного сигнала  $\alpha$ -СН-протона пролина бывает достаточно велика, например в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах Вос-Pro-OH, Вос-Pro-OODE [9], Ste-Gly-Pro-OH (II). Интенсивности

мажорного и минорного сигналов  $\alpha$ -СН-протонов пролина для этих соединений соотносятся как 3 : 2. Но, когда равновесие значительно смещено в сторону одного из конформеров, интенсивность минорного сигнала  $\alpha$ -СН-протона пролина бывает незначительна, и утверждать с уверенностью, что имеется второй конформер, можно, только если еще какой-либо сигнал  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра представляет собой совокупность мажорного и минорного [11]. Соотношение этих сигналов может изменяться, вплоть до исчезновения одного из них, при изменении концентрации, смене растворителя, добавлении солеобразующих или комплексообразующих соединений [11 - 13].

При анализе  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров синтезированных соединений (I, I\*, II, II\*, III, IV, VII, VII\*, VIII, VIII\*, XI, XI\*) нами были отмечены следующие особенности (см. таблицы):

**Таблица 1.** Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) и константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ , Гц) характеристических мажорных (M) и минорных (m) сигналов в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах *цис-транс*-конформеров пептидов, содержащих связь X-Pro

№	Соединение	$\alpha$ CH Pro		$\alpha$ CH <sub>2</sub> Gly		NH Gly и/или NH Phe		OCH <sub>3</sub> или OBU'	Соотношение интенсивностей сигналов (M) : (m)
		$\delta$ , м. д.	$J_{\text{AX}}$ , Гц	$\delta$ , м. д.	$J_{\text{AB}}, J_{\text{AX}} (J_{\text{BX}})$	$\delta$ , м. д.	$J_{\text{AX}}$ , Гц		
-	Вос-Pro-OH	4.23 дд(m) 4.34 дд(M)	4.0; 8.0 3.0; 8.0	-	-	-	-	-	3 : 2
(II)	Ste-Pro-OH	4.20 дд(m) 4.57 дд(M)	* 2.0; 8.0	-	-	-	-	-	>10 : 1
(VII)	Ste-Pro-Gly-OH	4.40 дд(m) 4.57 дд(M)	4.0; 7.0 2.0; 8.0	3.88 дд 4.09 дд	17.0; 4.0 17.0; 5.0	7.1 т(m) 7.37 т(M)	** **	-	4 : 1
(II)	Ste-Gly-Pro-OH	4.37 дд(m) 4.55 дд(M)	4.0; 7.0 4.0; 7.0	3.99 дд 4.16 дд	17.0; 4.0 17.0; 5.0	6.57 т(M) 6.90 т(m)	** **	-	3 : 2
(IV)	Ste-Pro-Gly-OBu'	4.33 дд(m)	5.8; 5.4	3.85 дд(m) 3.97 дд(m)	18.8; 5.9 18.8; 5.9	6.40 т(m)	5.9	1.44 с	6 : 1
(I)	Ste-Gly-Pro-OCH <sub>3</sub>	4.62 дд(M) 4.40 м(m) 4.55 м(M)	2.0; 8.0 4.5; 6.0 4.0; 8.0	3.86 д(M) 3.99 дд 4.11 дд	5.4 17.0; 4.0 17.0; 5.0	7.36 т(M) 6.42 т	** **	3.73 с(M) 3.76 с(m)	4 : 1
(VIII)	Ste-Pro-Gly-Phe-OBu'	4.30 дд(m) 4.45 дд(M)	* 4.0; 7.0	3.69 дд 4.13 дд	17.0; 5.0 17.0; 7.0	6.30 д(m) 6.97 д(M) 6.75 дд(m) 7.43 дд(M)	* 7.5 * 7.0; 5.0	1.35 с(M) 1.39 с(m)	>10 : 1
(XI)	Ste-Gly-Pro-Phe-OCH <sub>3</sub>	4.30 дд(m) 4.54 дд(M)	* 1.9; 7.8	3.82 дд 4.03 дд	17.8; 3.7 17.8; 4.2	6.40 т 6.80 д(m) ~7.1 (M)	** 8.6 ***	3.73 с	10 : 1

\* Константа ССВ не указана вследствие низкой интенсивности минорных сигналов.

\*\* Сигналы имеют характер уширенных триплетов.

\*\*\* Сигнал перекрывается сигналом ароматического кольца Phe.

Таблица 2. Характеристические сигналы в <sup>13</sup>С-ЯМР-спектрах стеароильных производных гидрофобных пролинсодержащих пептидов\*

№ по схеме	Соединение	Pro				Gly	Phe		-Ste					OR
		C <sub>α</sub>	C <sub>β</sub>	C <sub>γ</sub>	C <sub>δ</sub>		C <sub>α</sub>	C <sub>β</sub>	C2	C3	C4 - C15	C16	C17	
(III)	Ste-Pro-OH	60.56	27.56	24.99 22.60	48.40	-	-	34.92	25.23	29.77 29.88 30.10	32.36	23.11	14.48	-
(VII)	Ste-Pro-Gly-OH	60.18	28.27	25.11	48.12	42.0	-	35.11	25.36	29.90 30.11	32.35	23.09	14.48	-
(II)	Ste-Gly-Pro-OH	59.64	29.28 31.71	25.02 22.72	46.71 47.19	42.29	-	36.79	26.05	29.75 29.91 30.10	32.34	23.07	14.48	-
(IV)	Ste-Pro-Gly-OBu'	60.03	27.78	25.23	47.94	42.65	-	35.14	25.42	29.90 30.11	32.37	23.10	14.47	28.53 82.25
(I)	Ste-Gly-Pro-OMe	60.22	29.18	25.04	46.69	42.40	-	36.90	26.03	29.86 30.10	32.37	23.09	14.47	53.70
(VIII)	Ste-Pro-Gly-Phe-OBu'	60.42	28.02	25.02	47.89	43.67	54.22	38.45	25.47	30.08	32.33	23.08	14.44	28.37 82.50
(XI)	Ste-Gly-Pro-Phe-OMe	60.40	27.42	25.08	46.66	42.49	52.68	38.38	26.12	29.80 30.10	32.36	23.09	14.44	53.52

Примечание. Соответствующие дейтериймеченные аналоги (I\*, II\*, VII\*, VIII\*, XI\*) имели те же спектральные характеристики в <sup>13</sup>С-ЯМР. В таблице не указаны характеристические сигналы карбонильных С-атомов.

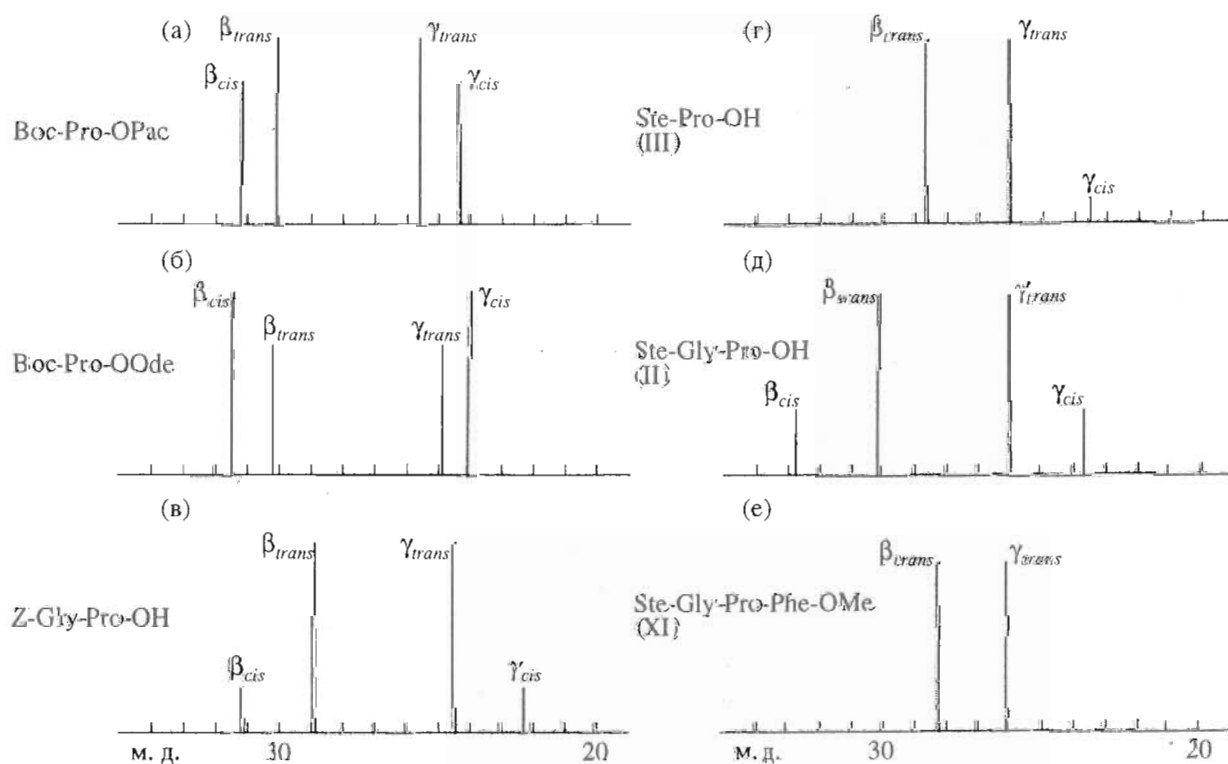
мажорный сигнал  $\alpha$ -СН-протона пролина в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах всех синтезированных стеариловых производных, включая Ste-Pro-OH (III), находится в области 4.45 - 4.62 м. д., тогда как минорный сигнал смещен в область более сильного поля. Следовательно, для этих соединений (I, I\*, II, II\*, III, IV, VII, VII\*, VIII, VIII\*, XI, XI\*) в хлороформе преобладают конформеры с одинаковой ориентацией в связи X-Pro независимо от природы X (Ste- или Gly). Как следует из рассмотрения спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (см. рисунок), доминирующим является *транс*-конформер;

равновесие между *цис-транс*-конформерами по связи X-Pro в хлороформе смещено в сторону *транс*-конформера намного сильнее, когда X – стеариловый остаток (в соединениях III, IV, VII, VII\*, VIII, VIII\*), чем когда X представляет собой остаток глицина (в соединениях I, I\*, II, II\*, XI, XI\*) или *трет*-бутилоксикарбоксильную группу. Ste-Pro-OH существует в хлороформе практически в виде одного *транс*-конформера, тогда как Вос-Pro-OH – в виде смеси двух конформеров с соотношением 3 : 2. Иными словами, в молекулах коротких пептидов стеариловый остаток оказывает большее влияние на форму предпочтительной конформации, чем аминокислотный остаток глицина или Вос-группа;

увеличение длины пептидной цепи на один аминокислотный остаток (Phe) приводит к заметному смещению равновесия *цис-транс* в пользу последнего. Соотношение интенсивностей сигналов (M) : (m) меняется от 4 : 1 для Ste-Gly-Pro-OCH<sub>3</sub> (I) до 10 : 1 для Ste-Gly-Pro-Phe-OCH<sub>3</sub> (XI) и от 6 : 1 для Ste-Pro-Gly-OBu' (IV) до > 10 : 1 для Ste-Pro-Gly-Phe-OBu' (VIII);

сигнал  $\alpha$ -СН<sub>2</sub>-протонов глицина в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах всех синтезированных немеченых стеариловых производных ди- и трипептидов (I, VII, II, VIII, XI) представляет собой совокупность двух симметричных дублетов дублетов. Это говорит о неэквивалентности этих протонов и наличии затруднений в свободном вращении вокруг связей -NH-CH<sub>2</sub>-CO-фрагмента молекул пептидов (I, VII, II, VIII, XI);

$^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектры водных дисперсий смесей фосфатидилхолина и соединений Ste-Pro\*-Gly-OH (VII\*) и Ste-\*Gly-Pro-OH (II\*) в соотношении 10 : 1 практически идентичны  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектрам водной дисперсии чистого ФХ. Встроенные в фосфатидилхолиновый бислой дейтерированные стеариловые производные (VII\*) и (II\*) дают характерные сигналы квадрупольного расщепления в спектрах  $^2\text{H}$ -ЯМР со значениями 9.3 и 6.2 кГц для (VII\*) и 7.0 кГц для (II\*). Появление второго сигнала квадрупольного расщепления может



Положение и интенсивность сигналов  $\beta$ - и  $\gamma$ -СН<sub>2</sub> атомов углерода пирролидинового кольца пролина в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР в  $\text{CDCl}_3$  в соединениях, содержащих связь X-Pro. а, б, в – данные: [14], [9] и [11] соответственно, г, д, е – наши данные.

быть связано как с наличием *цис-транс*-конформеров, так и с неэквивалентностью дейтеронов Gly\*.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали аминокислоты L-ряда, а также их производные фирмы Reanal (Венгрия); [C<sup>α-2</sup>H<sub>2</sub>]глицин, стеариновую кислоту, трифторуксусную кислоту, триэтиламин, яичный фосфатидилхолин отечественного производства; N-гидроксисукцинимид, изобутилхлоркарбонат, дициклогексилкарбодиимид (Fluka, Швейцария); 1-гидроксibenзотриазол, N-метилморфолин (Aldrich, США). Стеароильные производные аминокислот Gly, [C<sup>α-2</sup>H<sub>2</sub>]Gly и Pro получали по методике [15].

Ход реакций и гомогенность веществ контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol (ЧСФР), использовали следующие системы растворителей: хлороформ-ацетон-метанол, 10 : 1 : 1 (А); хлороформ-ацетон-метанол, 18 : 1 : 1 (Б); хлороформ-ацетон-метанол-триэтиламин, 10 : 1 : 1 : 0.1 (В); бензол-ацетон-уксусная кислота, 10 : 5 : 0.2 (Г). Вещества на хроматограммах обнаруживали опрыскиванием 0.5% раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием (аминокислотные и пептидные производные); прокаливанием при 250 - 300°C (высшие алифатические производные). Для адсорбционной колоночной хроматографии использовали силикагель L 40/100 (ЧСФР) и хлороформ в качестве элюента.

Температуру плавления определяли на приборе Voetius (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-, <sup>13</sup>C-спектры растворов пептидов в CDCl<sub>3</sub>, <sup>2</sup>H- и <sup>31</sup>P-ЯМР-спектры пептидов в гидратированных дисперсиях фосфатидилхолина записывали на импульсном фурье-спектрометре Bruker MSL-200 (ФРГ) с рабочими частотами 200.13; 75.5; 30.7 и 80.9 МГц соответственно при температуре 30°C. В качестве внутреннего стандарта использовали гексаметилдисилоксан. <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры пептидов, содержащих [C<sup>α-2</sup>H<sub>2</sub>]глицин, были аналогичны спектрам немеченых аналогов.

ВЭЖХ осуществляли на хроматографе фирмы Knauer (ФРГ), в препаративном варианте – на колонке (16 × 150 мм) Lichrospher 100 RP-18 (5 мкм, Knauer, ФРГ), в аналитическом – на колонке (3.3 × 150 мм) Lichrospher 100 RP-18 (5 мкм, Knauer, ФРГ). Соединения, содержащие остаток фенилаланина, выделяли в режиме градиентного элюирования от 20 до 100% системы (Е) в (Д) за

20 мин при скорости потока 5 мл/мин ((Д) – 40% (по объему) воды в метаноле; (Е) – 50% (по объему) хлороформа в метаноле), детектировали при длине волны 254 нм. В остальных случаях использовали рефрактометрический детектор RIx8 и элюирование метанолом при скорости потока 10 мл/мин.

**Метилловый эфир стеароил[C<sup>α-2</sup>H<sub>2</sub>]глицилпролина (I\*).** К охлажденному до -5°C раствору 250 мг (0.73 ммоль) стеароил[C<sup>α-2</sup>H<sub>2</sub>]глицина в диметилформамиде добавляли 180 мг (0.87 ммоль) DCC и 198 мг (1.46 ммоль) НОВТ. Через 30 мин добавляли 144 мг (0.87 ммоль) хлоргидрата метилового эфира пролина и 96 мкл (0.87 ммоль) N-метилморфолина. Реакционную массу перемешивали 1 ч при 0°C и 8 ч при 20°C, затем разбавляли этилацетатом, отфильтровывали осадок дициклогексилмочевины. Фильтрат промывали 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 10% лимонной кислотой, H<sub>2</sub>O до pH 7, насыщенным раствором NaCl, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали, продукт выделяли с помощью адсорбционной колоночной хроматографии. Выход 161 мг (45%). Т. пл. 92 - 93°C. R<sub>f</sub> 0.35 (Б). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.85 (3H, т, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (28H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-), 1.65 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.80 - 2.15 (4H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 2.22 (2H, т, -CH<sub>2</sub>-), 3.40 - 3.70 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 3.73 (3H, с(М), OCH<sub>3</sub>), 3.76 (3H, с(м), OCH<sub>3</sub>), 4.40 (1H, м(м), αCH Pro), 4.55 (1H, м(М), αCH Pro), 6.45 (1H, с, NH).

**Стеароил[C<sup>α-2</sup>H<sub>2</sub>]глицилпролин (II\*).** К 151 мг (0.33 ммоль) соединения (I\*) в 1 мл диоксана добавляли 1.5 мл 1 н. NaOH в 70% водном метаноле. Перемешивали 3 ч при 20°C, затем реакционную массу подкисляли при охлаждении до 0°C, выпавший осадок отфильтровывали, перекристаллизовывали из смеси этилацетат-эфир. Выход 101 мг (69%). Т. пл. 67 - 68°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -4.4° (с 0.5, CHCl<sub>3</sub>), R<sub>f</sub> 0.33 (В), 0.35 (Г). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.87 (3H, т, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (28H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-), 1.65 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.85 - 2.25 (4H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 3.40 - 3.75 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 4.37 (1H, дд(м), αCH Pro), 4.55 (1H, дд(М), αCH Pro), 6.57 (1H, с(М), NH), 6.90, (1H, с(м), NH).

**Метилловый эфир стеароил-глицилпролина (I) и стеароил-глицилпролин (II)** получали аналогично дейтериймеченым соединениям (I\*) и (II\*) соответственно.

**Стеароил-пролин (III)** получали по методике [15] из 381 мг (1 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира стеариновой кислоты, 138 мг (1.2 ммоль) L-Pro и 0.5 мл (3.5 ммоль) триэтиламина. Выход 292 мг (74%). Т. пл. 60 - 62°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -107° (с 1, CHCl<sub>3</sub>). R<sub>f</sub> 0.40 (В). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.85 (3H, т, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (28H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-), 1.61 (2H, м,

-CH<sub>2</sub>-), 1.72 - 2.13 (3H, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 2.38 (2H, τ, -CH<sub>2</sub>-), 2.45 - 2.57 (1H, м, βCH<sub>2</sub> Pro), 3.40 - 3.62 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 4.20 (1H, дд(м), αCH Pro), 4.57 (1H, дд(М), αCH Pro).

**трет-Бутиловый эфир стеароил-пролилглицина (IV)** получали аналогично соединению (I\*) из 180 мг (0.46 ммоль) стеароил-пролина (III), 113 мг (0.55 ммоль) DCC, 125 мг (0.92 ммоль) НОВТ, 92 мг (0.55 ммоль) хлоргидрата трет-бутилового эфира глицина и 60 мкл (0.55 ммоль) N-метилморфолина. Выделяли методом адсорбционной колоночной хроматографии 202 мг (87%) вещества (IV). Т. пл. 50 - 51°C.  $[\alpha]_D^{20} -101^\circ$  (с 1, CHCl<sub>3</sub>).  $R_f$  0.67 (А), 0.44 (Б). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.87 (3H, τ, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (28H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-), 1.45 (9H, с(М), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-), 1.49 (9H, с(м), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-), 1.65 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.80 - 2.47 (6H, β, γCH<sub>2</sub> Pro, -CH<sub>2</sub>-), 3.33 - 3.67 (2H, δCH<sub>2</sub> Pro), 3.86 (2H, д(М), αCH<sub>2</sub> Gly), 3.85, 3.97 (2H, дд(м), αCH<sub>2</sub> Gly), 4.32 (1H, дд(м), αCH Pro), 4.62 (1H, дд(М), αCH Pro), 6.40 (1H, τ(м), NH), 7.37 (1H, τ(М), NH).

**N-трет-Бутилоксикарбонил-пролил[C<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицин (V\*)**. 261 мг (3 ммоль) [C<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицина и 252 мг (3 ммоль) NaHCO<sub>3</sub> в 2 мл H<sub>2</sub>O охлаждали до 0°C (раствор аминокомпонента). К охлажденному до -10°C раствору 430 мг (2 ммоль) Вос-Pro в 5 мл THF при перемешивании добавляли 220 мкл (2 ммоль) N-метилморфолина и 260 мкл (2 ммоль) изобутилхлоркарбоната. Через 15 мин добавляли раствор аминокомпонента, перемешивали 1 ч при -5°C, затем 3 ч при 20°C. THF упаривали, реакционную массу подкисляли 10% лимонной кислотой, выпавший осадок экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Сушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток дважды перекристаллизовывали из смеси этилацетат-петролейный эфир. Выход 290 мг (51%). Т. пл. 171 - 173°C.  $[\alpha]_D^{20} -73^\circ$  (с 0.5; CH<sub>3</sub>OH).  $R_f$  0.71 (В), 0.27 (Г).

**Трифторацетат пролил[C<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицина (VI\*)** получали из 210 мг (1.14 ммоль) соединения (V\*) обработкой 50% ТФА в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> в течение 15 мин с последующим упариванием и осаждением из эфира. Выход 190 мг (87%).

**Стеароил-пролил[C<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицин (VII\*)**. 251 мг (0.66 ммоль) N-оксисуццинимидного эфира стеариновой кислоты, 190 мг (0.66 ммоль) соединения (VI\*), 277 мкл (2 ммоль) триэтиламина в смеси 1 мл H<sub>2</sub>O и 5 мл ацетона перемешивали 72 ч при 20°C. Затем ацетон упаривали, подкисляли 10% лимонной кислотой до pH 3, выпавший осадок экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу промывали насыщенным раствором NaCl, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Вещество выделяли с помощью обра-

щенно-фазовой ВЭЖХ. Время удерживания продукта 3.5 мин. Выход 190 мг (65%). Т. пл. 95 - 96°C.  $[\alpha]_D^{20} -91^\circ$  (с 0.5; CHCl<sub>3</sub>).  $R_f$  0.44 (А), 0.38 (Г). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.87 (3H, τ, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (28H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-), 1.60 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.80 - 2.35 (4H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro), 3.40 - 3.58 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 4.40 (1H, дд(м), αCH Pro), 4.57 (1H, дд(М), αCH Pro), 7.1 (1H, с(м), NH), 7.35 (1H, с(М), NH).

**Стеароил-пролилглицин (VII)** получали из 170 мг (0.34 ммоль) соединения (IV) обработкой ТФА в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> в течение 30 мин с последующим упариванием и перекристаллизацией из смеси этилацетат-петролейный эфир. Выход 133 мг (90%). Т. пл. 96 - 98°C.  $[\alpha]_D^{20} -90.5^\circ$  (с 0.5; CHCl<sub>3</sub>).  $R_f$  0.35 (В), 0.38 (Г).

**Полностью защищенные производные трипептидов (VIII, VIII\*, XI, XI\*)**. К раствору 0.25 ммоль карбоксикомпонента в THF добавляли 0.30 ммоль DCC и 0.5 ммоль НОВТ при -5°C; через 30 мин добавляли 0.30 ммоль N-метилморфолина и 0.30 ммоль аминокомпонента. Реакционную массу перемешивали 1 ч при 0°C и 48 ч при 20°C, затем удаляли THF на роторном испарителе, разбавляли этилацетатом, отфильтровывали дициклогексилмочевину. Фильтрат промывали по 3 раза 5% NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 10% лимонной кислотой, H<sub>2</sub>O до pH 7, насыщенным раствором NaCl, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали. Вещество выделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

**трет-Бутиловый эфир стеароил-пролил-глицил-фенилаланина (VIII)**. Выход 120 мг (75%) в виде масла.  $[\alpha]_D^{20} -12^\circ$  (с 2; CHCl<sub>3</sub>).  $R_f$  0.44 (Б). ВЭЖХ, время удерживания 17.2 мин. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.87 (3H, τ, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (28H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-), 1.35 (9H, с(М), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-), 1.39 (9H, с(м), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-), 1.60 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.80 - 2.40 (6H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro, -CH<sub>2</sub>-), 3.07 (2H, д, βCH<sub>2</sub> Phe), 3.33 - 3.56 (2H, м, δCH<sub>2</sub> Pro), 3.69, 4.13 (2H, дд, αCH<sub>2</sub> Gly), 4.30 (1H, дд(м), αCH Pro), 4.45 (1H, дд(М), αCH Pro), 4.67 (1H, м, αCH Phe), 6.30 (1H, д(м), NH Phe), 6.75 (1H, дд(м), NH Gly), 6.97 (1H, д(М), NH Phe), 7.21 (5H, м, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-), 7.43 (1H, дд(М), NH Gly).

**трет-Бутиловый эфир стеароил-пролил[C<sup>α</sup>-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицил-фенилаланина (VIII\*)**. Выход 118 мг (75%) в виде масла.  $[\alpha]_D^{20} -12^\circ$  (с 2; CHCl<sub>3</sub>).  $R_f$  0.44 (Б). ВЭЖХ, время удерживания 17.8 мин.

**Метилловый эфир N-стеароил-глицил-пролил-фенилаланина (XI)**. Выход 36 мг (24%). Т. пл. 83 - 84°C.  $[\alpha]_D^{20} -25^\circ$  (с 1; CHCl<sub>3</sub>).  $R_f$  0.56 (А). ВЭЖХ, время удерживания продукта 18 мин. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (δ, м. д.): 0.87 (3H, τ, CH<sub>3</sub>-), 1.25 (28H, м, -(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-), 1.65 (2H, м, -CH<sub>2</sub>-), 1.73 - 2.36 (6H, м, β, γCH<sub>2</sub> Pro, -CH<sub>2</sub>-), 2.93 - 3.25 (2H, дд,

$\beta$ CH<sub>2</sub> Phe), 3.25 - 3.45 (2H, м,  $\delta$ CH<sub>2</sub> Pro), 3.73 (3H, с, OCH<sub>3</sub>), 3.82, 4.03 (2H, дд,  $\alpha$ CH<sub>2</sub> Gly), 4.31 (1H, дд(м),  $\alpha$ CH Pro), 4.54 (1H, дд(М),  $\alpha$ CH Pro), 4.80 - 4.90 (1H, м,  $\alpha$ CH Phe), 6.40 (1H, дд, NH Gly), 6.8 (1H, дд(м), NH Phe), 7.1 (1H, дд(М), NH Phe), 7.22 (5H, м, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-).

Метилловый эфир стеароил[C <sup>$\alpha$</sup> -<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]глицил-пролил-фенилаланина (XI\*). Выход 28 мг (19%). Т. пл. 81 - 82°C.  $[\alpha]_D^{20}$  -25°C (с 1; CHCl<sub>3</sub>). R<sub>f</sub> 0.56 (А). ВЭЖХ, время удерживания продукта 18.3 мин.

Приготовление образцов для исследования методом <sup>2</sup>H- и <sup>31</sup>P-ЯМР. К 10 мг пептида добавляли раствор лецитина в хлороформе с концентрацией 100 мг/мл в количестве, необходимом для получения соотношения липид/пептид 10 : 1, и 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-НСl-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. Хабарова Е.И., Дубовский П.В., Василенко И.А., Звонкова Е.Н., Гусев Д.Г., Огрьель А.А. // Биол. мембраны. 1989. Т. 6. № 4. С. 378 - 385.

2. Дубовский П.В., Есипова О.В., Хабарова Е.И., Гусев Д.Г., Василенко И.А., Звонкова Е.Н. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. № 6. С. 640 - 646.  
 3. Дубовский П.В., Есипова О.В., Василенко И.А., Звонкова Е.Н. // Биол. мембраны. 1992. Т. 9. № 2. С. 184 - 192.  
 4. Yaron A., Naider F. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1993. V. 28. № 1. P. 31 - 81.  
 5. Radzicka A., Acheson S., Walfenden R. // Bioorg. Chem. 1992. V. 20. P. 382 - 386.  
 6. Wetlaufer B. // Biopolymers. 1985. V. 24. P. 251 - 255.  
 7. Yaron A. // Biopolymers. 1987. V. 26 (S). P. S215 - S222.  
 8. Johnson V.G., Nicholls P.J., Habig W.H. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 5. P. 3514 - 3519.  
 9. Исхакова Ф.Х., Есипова О.В., Звонкова Е.Н. // Биоорган. химия. 1995. Т. 23. № 7. С. 517 - 523.  
 10. Шредер Э., Любке К. Пептиды. М.: Мир, 1967. С. 202 - 203.  
 11. Luthman K., Hacksell U. // Acta chem. scand. 1993. V. 47. № 5. P. 461 - 468.  
 12. Vicent C., Hirst S.C., Garcia-Tellado F., Hamilton A.D. // J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. № 14. P. 5466 - 5467.  
 13. Dupont V., Lecoq A., Mangeot J.-P., Aubry A. // J. Amer. Chem. Soc. 1993. V. 115. № 20. P. 8898 - 8906.  
 14. Hondrelis J., Lonergan G., Voleotis S., Matsoukas J. // Tetrahedron. 1990. V. 46. № 2. P. 565 - 576.  
 15. Paquet A. // Can. J. Biochem. 1980. V. 58. № 6. P. 573 - 576.

Synthesis of Stearoyl Derivatives of Proline-Containing Peptides

F. Kh. Iskhakova,<sup>1</sup> O. V. Esipova, and E. N. Zvonkova

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

**Abstract** – Hydrophobic stearoyl derivatives of proline-containing di- and tripeptides and their deuterated analogs were synthesized. It was shown by NMR spectroscopy that *cis-trans*-equilibrium around an X-Pro peptide bond is displaced towards *trans*-conformers for compounds containing a Ste-Pro fragment as opposed to the compounds containing Boc-Pro or Gly-Pro fragments.

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

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.