



УДК 547.466.22 + 577.152.344

© 1991 г.

*О. В. Есипова, С. В. Еремин, Е. Н. Звонкова***СИНТЕЗ ТРИПЕПТИДА ГЛИЦИЛ-*L*-ЛЕЙЦИЛ-*L*-ФЕНИЛАЛАНИНА И ЕГО АНАЛОГОВ***Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Получен пептид Gly-Leu-Phe и его производные с применением DCC/НОВТ-метода удлинением с С-конца и ферментативным способом в присутствии папаина с использованием в качестве ацильных доноров эфиров *Z*-глицина и *Z*-лейцина. Показано, что химический способ, как и ферментативный, не сопровождается заметной рацемизацией. Разработаны условия ВЭЖХ для разделения и препаративного выделения продуктов ферментативных реакций.†

Гидрофобные трипептиды состава Gly-Xaa-Phe (Xaa = Ala, Val, Leu, Phe), а также их ретроизомеры (Phe-Xaa-Gly) в последние годы привлекают большое внимание исследователей в связи с обнаружением такого рода белковых фрагментов, так называемых «белковых мотивов», в консервативных участках аминокислотных последовательностей белков самого разнообразного происхождения, причем для них отмечена высокая биологическая активность. Так, трипептид Gly-Leu-Phe из казеина обладает иммуностимулирующим действием [1], N-концевые пептиды оболочечного белка F₁ вируса иммунодефицита приматов включают в себя ретроструктуру Phe-Leu-Gly и играют ключевую роль при слиянии вируса с мембраной клетки-хозяина [2], пептид *Z-D*-Phe-*L*-Leu-Gly обладает неспецифическим действием против вируса кори [3].

Продолжая наши работы по получению гидрофобных пептидов, их N-ацил-, O-алкилпроизводных (C₁₈) и дейтерированных аналогов и изучению их взаимодействия с фосфолипидным бислоем методами ЯМР на ядрах ²H и ³¹P [4—6], мы разработали пути синтеза подобных соединений на примере получения пептида Gly-Leu-Phe и его производных. Основные вопросы, которые были решены,— это выбор защитных групп, методов активации, повышение выхода целевых веществ и проблема рацемизации, так как, по-видимому, примеси пептидов с *D*-антиподами аминокислот могут не только снижать активность, но и изменять ее характер на противоположный [3].

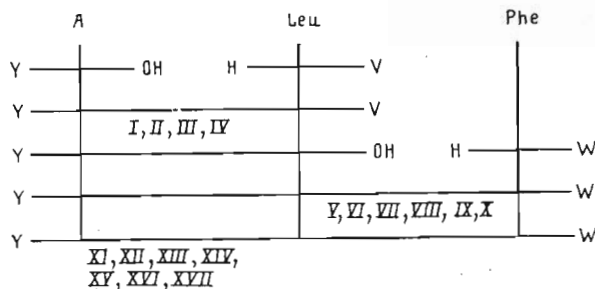
Данные о пептидах, полученных с применением классических методов пептидного синтеза, представлены в табл. 1 *. Наиболее успешным было применение DCC/НОВТ-метода; метод смешанных ангидридов оказался неприемлемым. Последовательность создания пептидных связей обусловлена использованием N-стеароилглицина и O-октадецилфенилаланина [7] в качестве исходных соединений, так как ступенчатое наращивание пептида с N-конца осуществить при применении этих производных не удалось.

Ряд сомнений относительно оптической чистоты полученных веществ заставил нас обратиться к ферментативному методу синтеза, который в 1985 г. успешно использовали Запевалова, Горбунова и Митин [8] для создания пептида Gly-Phe-Leu, являющегося фрагментом [Leu]энкефа-

Использованные сокращения: НОВТ — гидроксibenзотриазол, HONSu — N-гидроксисукцинимид, St — стеароил-; аминокислоты, где не указано особо,— *L*-ряда.

* Синтез и характеристика дейтерированных соединений, которые не описаны в «Экспериментальной части», публикуются в очередной работе из серии «Изучение методом ЯМР широких линий взаимодействия гидрофобных пептидов с фосфолипидным бислоем» (Дубовский и др. «Биологические мембраны», 1991).

Химический синтез Gly-Leu-Phe и его производных



Соединение	Y	A	V	W	Метод	Выход, %
I	Boc	Gly	OH	—	HONSu	90
II	Z	Gly *	OBu ^t	—	DCC/HOBT	62
III	St	Gly	OH	—	HONSu	59
IV	St	Gly *	OBu ^t	—	DCC/HOBT	51
V	Boc	Gly	—	OBu ^t	»	61
VI	Z	Gly *	—	OBu ^t	»	68
VII	St	Gly	—	OBu ^t	»	78
VIII	St	Gly *	—	OBu ^t	»	53
IX	Boc	Gly	—	OAlk	»	61
X	Z	Gly *	—	OAlk	»	66
XI	H	Gly	—	OH	CF ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	91
XII	H	Gly *	—	OH	HBr/CH ₃ COOH	85
XIII	St	Gly	—	OH	CF ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	76
XIV	St	Gly *	—	OH	»	91
XV	H	Gly	—	OAlk	»	89
XVI	H	Gly *	—	OAlk	HBr/CH ₃ COOH	92
XVII	Z	Gly *	—	OH	CF ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂	96

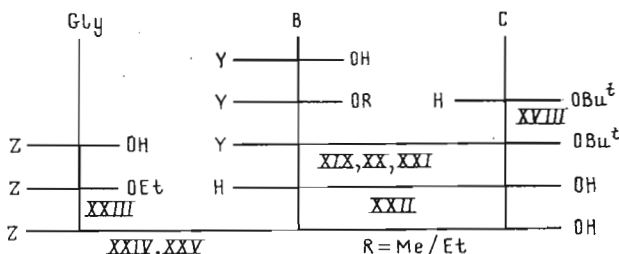
Примечание: Gly * = —NHCH₂CO—; St = C₁₇H₃₅CO—; OAlk = —OC₁₃H₂₇—.

лина. В качестве С-концевой защиты авторы использовали *трет*-бутилоксигруппу, которая не часто применяется в ферментативных реакциях.

Чтобы убедиться в достаточной пригодности данной защитной группы для ферментативного синтеза, мы получили дипептид Boc-Phe-Leu-OBu^t (XIX) (табл. 2) с помощью химотрипсина. Для подавления амидазной активности фермента в реакционную среду добавляли диметилформамид [9]. Относительное содержание целевого продукта в реакционной смеси

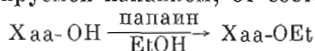
Таблица 2

Ферментативный синтез трипептидов состава (Gly, Leu, Phe)



Соединение	B	C	Y	Выход, %	Фермент (метод)
XIX	Phe	Leu	Boc	72	Химотрипсин
XX	Phe	Leu	Z	74	Папаин [8]
XXI	Leu	Phe	Z	70	Папаин
XXII	Leu	Phe	—	92	(HBr/AcOH)
XXIV	Leu	Phe	—	40	Папаин
XXV	Phe	Leu	—	79	» [8]

Зависимость выхода этиловых эфиров N-защищенных Phe и Gly в реакции, катализируемой папаином, от состава реакционной среды



Xaa-OH	Органический растворитель	Соотношение буфер/ орг. растворитель/ этанол	Выход Xaa-OEt, %
Вос-Phe	CH ₂ Cl ₂	3/1/1	29
Вос-Phe	CH ₂ Cl ₂	1/1/1	25
Вос-Phe	CHCl ₃	1/2/1	24
Вос-Phe	CHCl ₃	3/1/1	52
Вос-Gly	CH ₂ Cl ₂	3/5/1	55
Z-Phe	CHCl ₃	3/1/1	85
Z-Gly	CHCl ₃	3/1/1	64

после предварительной ее обработки составило 72% (данные препаративной ВЭЖХ, условия см. «Экспериментальную часть»). Полученный ферментативным путем дипептид (XIX) по ¹H-ЯМР-спектру, ТСХ, удельному углу оптического вращения и температуре плавления идентичен дипептиду, синтезированному с помощью DCC-метода. Проведенная реакция подтвердила пригодность *трет*-бутиловых эфиров в качестве C-защитной группы для аминокompонента в ферментативных реакциях. Кроме того, мы убедились, что *трет*-бутильная группа не подвергается ферментативному отщеплению.

Для ферментативного синтеза Z-Gly-Leu-Phe-OH (XXIV) мы выбрали трехстадийную схему с использованием в качестве аминокompонентов *трет*-бутилового эфира (XVIII) (при получении дипептида (XXI)) и свободного дипептида (XXII) (на стадии образования трипептида) и папаина (табл. 2), который обладает более широкой специфичностью по сравнению с химотрипсином [10]. С помощью папаина мы получили также этиловые эфиры N-защищенных глицина и фенилаланина, которые затем использовались в ферментативных реакциях в качестве ацильных доноров (использовали коммерческий метиловый эфир N-бензилкарбониллейцина).

При получении этиловых эфиров мы применили «равновесный подход» [11]. Смещение равновесия ферментативной реакции в сторону синтеза эфира достигалось благодаря использованию двухфазной системы за счет удаления продукта из сферы реакции в органическую фазу. В работе [10] при получении эфиров Вос-аминокислот в качестве органической фазы брали хлористый метилен. Однако, на наш взгляд, предпочтительнее применять хлороформ, так как температура кипения хлористого метилена близка к температуре проведения реакции (37° С) и поэтому сложнее поддерживать постоянным состав реакционной среды. Соотношение водной и органической фаз также оказывает влияние на выход целевого продукта (табл. 3). Лучшие результаты были нами получены для Z-производных глицина и фенилаланина в хлороформе при соотношении буфер — хлороформ — этанол, 3 : 1 : 1.

При получении дипептида Z-Leu-Phe-OBu' (XXI) и трипептида Z-Gly-Leu-Phe-OH (XXIV) мы использовали метод кинетического контроля [12, 13]. В качестве карбоксильного компонента при синтезе дипептида (XXI) был взят 2—3-кратный избыток метилового эфира N-бензилкарбониллейцина. Синтез проводился в щелочной среде, когда опасность вторичного гидролиза амидной связи минимальна [14]. За ходом реакции следили с помощью аналитической ВЭЖХ на обращенной фазе. Были подобраны условия, при которых наблюдается четкое разделение исходного компонента (Z-Leu-OMe) и продукта реакции (Z-Leu-Phe-OBu') (рис. 1): изократическое элюирование 75% ацетонитрилом в воде (по объему). Для оценки истинных количеств исходного и конечного компонентов была произведена калибровка по этим соединениям. Следует отметить, что идентификация аминокompонента H-Phe-OBu' и продукта гидролиза ацильного донора (Z-Leu-OH) при данных условиях ВЭЖХ

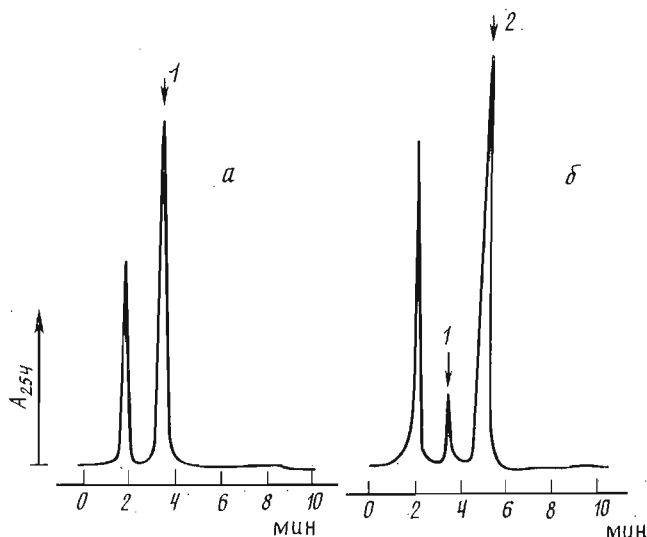


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ реакционной смеси, полученной в ходе катализируемого папаином синтеза $Z\text{-Leu-Phe-OBu}^t$ (XXI) из $Z\text{-Leu-OMe}$ до прибавления фермента (а) и через 180 мин после прибавления фермента (б). Условия ВЭЖХ см. «Экспер. часть». 1 — $Z\text{-Leu-OMe}$; 2 — $Z\text{-Leu-Phe-OBu}^t$

невозможна, так как эти вещества на хроматограммах наблюдались в виде одного пика с небольшим временем удерживания. Поэтому количество образующегося в ходе параллельной реакции гидролиза $Z\text{-Leu-OH}$ мы рассчитывали по разности между исходным количеством $Z\text{-Leu-OMe}$, текущей концентрацией $Z\text{-Leu-OMe}$ и количеством образовавшегося дипептида. На основании данных аналитической ВЭЖХ мы построили зависимость молярного состава реакционной смеси от времени реакции (рис. 2). Видно, что в течение 2 ч инкубации количество целевого дипептида постепенно нарастает, а затем практически не изменяется (кривая 3), в то время как количество исходного метилового эфира N -бензилоксикарбониллейцина продолжает уменьшаться (кривая 1) за счет ферментативного гидролиза (кривая 2). Заметим, что гидролиз $Z\text{-Leu-OMe}$ обусловлен только действием папаина, а не щелочной средой реакции (pH 9), так как инкубация исходных компонентов в отсутствие фермента при тех же условиях в течение 3 ч не приводит к каким-либо изменениям в реакционной смеси (по данным ВЭЖХ и ТСХ). Максимальный выход дипептида $Z\text{-Leu-Phe-OBu}^t$ (XXI) составил 70%. В работе [8] выход дипептида ретропоследовательности $Z\text{-Phe-Leu-OBu}^t$ (XX) 74%. Таким образом, в данном случае папаин обладает примерно одинаковой специфичностью по отношению к лейцину и фенилаланину.

При синтезе трипептида $Z\text{-Gly-Leu-Phe-OH}$ (XXIV) мы использовали 3-кратный избыток карбоксильного компонента ($Z\text{-Gly-OEt}$ (XXIII)) по отношению к аминокомпоненту ($\text{HBr}\cdot\text{H-Leu-Phe-OH}$ (XXII)) при pH 8,4. Трипептид был получен за 1,5 ч инкубации с папаином. В реакционной массе присутствует также $Z\text{-Gly-OH}$, который образуется в результате гидролиза $Z\text{-Gly-OEt}$, взятого в избытке. Следует отметить, что $Z\text{-Gly-OH}$ и $Z\text{-Gly-Leu-Phe-OH}$ (XXIV) имеют одинаковую подвижность при ТСХ, что затрудняет их разделение. С той же проблемой столкнулись авторы работы [8], у которых возникли трудности с отделением трипептида $Z\text{-Gly-Phe-Leu-OH}$ (XXV) от $Z\text{-Gly-OH}$. Но подобранная нами система растворителей для ВЭЖХ на обращенной фазе (градиентное элюирование от 40% воды в метаноле до 50% хлороформа в метаноле (по объему) за 20 мин) позволила легко отделить друг от друга целевой трипептид (XXIV) и продукт гидролиза $Z\text{-Gly-OH}$ (разница во временах удерживания около 5 мин — см. рис. 3). На стадии образования трипептида (XXIV) удалось достичь 40% выхода.

Рис. 2. Зависимость молярного состава реакционной смеси в ходе ферментативного синтеза дипептида Z-Leu-Phe-OBu^t (XXI) от времени реакции. Условия: 0,191 ммоль ацильного донора Z-Leu-OMe, 0,07 ммоль аминокомпонента HCl·H-Phe-OBu^t, 0,4 ммоль папаина, 0,2 М К₂HPO₄, 0,2 М EDTA, 0,4 М меркаптоэтанол, 30% метанол (по объему), pH 9, общий объем 1 мл. 1 — Z-Leu-OMe; 2 — Z-Leu-OH; 3 — Z-Leu-Phe-OBu^t

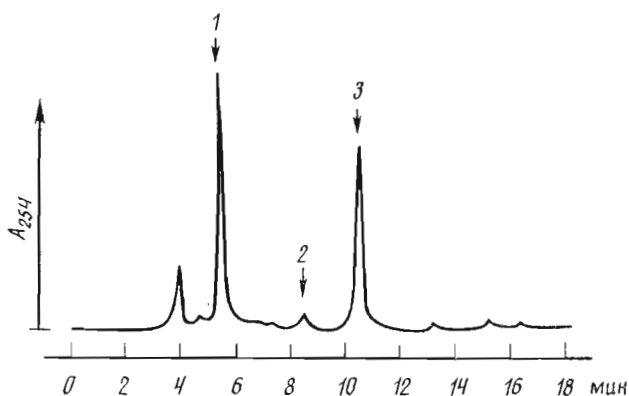
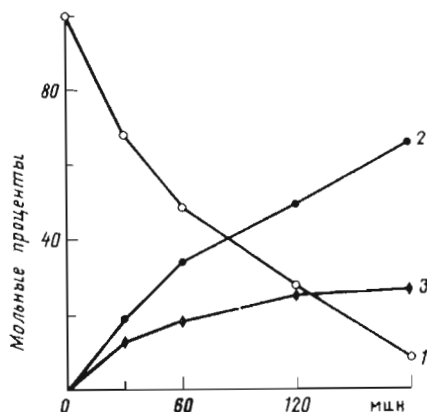


Рис. 3. ВЭЖХ-анализ реакционной смеси, полученной в ходе синтеза трипептида Z-Gly-Leu-Phe-OH (XXIV), катализируемого папаином (время реакции 90 мин). Условия ВЭЖХ см. «Экспер. часть», 1 — Z-Gly-OH; 2 — Z-Gly-OEt; 3 — Z-Gly-Leu-Phe-OH

Для контроля степени рацемизации пептиды (XIX) и (XXIV) были получены также классическим химическим синтезом. В пределах точности измерения $[\alpha]_D^{20}$ различий для пептидов, полученных разными методами, зафиксировать не удалось, что позволяет сделать вывод о принципиальной возможности использования как химического, так и ферментативного подхода для получения оптически чистых производных трипептида Gly-Leu-Phe.

Экспериментальная часть

В работе использовался α -химотрипсин отечественного производства, папаин (Merck, ФРГ), производные аминокислот *L*-ряда (Reanal, Венгрия), [C $_{\alpha}$ -²H₂]глицин (ВО «Изотоп», атомная доля изотопа 97%). Для контроля хода реакций применялась ТСХ на пластинках Silufol (Чехо-Словакия), обнаружение веществ осуществляли 0,5% раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием. ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на импульсном фурье-спектрометре MSL-200 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 200 МГц, используя растворы веществ в C²HCl₃ (где не указано особо) и тетраметилсилан в качестве внутреннего стандарта. Температуры плавления измеряли на приборе Boettius (ГДР), углы оптического вращения — на спектрополяриметре Perkin—Elmer MC-241M (Великобритания). ВЭЖХ осуществляли на приборе фирмы Knauer (ФРГ), в препаративном варианте — на колонке (16 × 250 мм) Lichrospher 100 RP-18 (5 мкм, Knauer, ФРГ), в аналитическом — на колонке (3,3 × 150 мм) Separon SGXC-18 (7 мкм, Ково, Чехо-Словакия); детектирование УФ при длине волны 254 нм. Использовались следующие системы растворителей: А — 40% (по объему) воды в метаноле; Б — 50% (по объему) хлороформа в метаноле; В — 75% (по объему) ацетонитрила в воде.

Этиловые эфиры N-защищенных глицина и фенилаланина. 40 мг (1,6 мкмоль) папаина растворяли в 1 М цитрат-фосфатном буфере (рН 4,2), активировали 72 мг хлоргидрата цистеина и 120 мкл 1 М EDTA. Затем прибавляли определенное количество хлористого метилена или хлороформа (см. табл. 3), 2 ммоль N-защищенной аминокислоты (Woc-Phe, Woc-Gly, Z-Phe, Z-Gly) и этанол. Реакцию вели при интенсивном перемешивании при 37° С в течение 40 ч. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе бензол — гептан — ацетон, 5 : 2 : 2. Этиловые эфиры N-защищенных Phe и Gly в данной системе обладают одинаковой хроматографической подвижностью, R_f 0,78. Реакционную массу экстрагировали хлористым метилом либо хлороформом (4×10 мл). Органическую фазу промывали насыщенным раствором NaHCO_3 (3×10 мл), затем насыщенным раствором NaCl (3×10 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали, досушивали в вакууме. Условия и выходы реакций представлены в табл. 3.

Woc-Phe-OEt. ^1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 1,25 (3H, м, CH_3), 1,45 (9H, с, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$), 3,10 (2H, м, CH_2), 4,2 (2H, м, OCH_2CH_3), 4,6 (1H, м, CH), 5,05 (1H, д, NH), 7,15 (5H, м, C_6H_5); $[\alpha]_D^{20} +44 \pm 0,5^\circ$ (с 3, CHCl_3); $+20 \pm 0,5^\circ$ (с 1, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 1 : 1); $-5,5 \pm 0,5^\circ$ (с 1, CH_3OH) ($[\alpha]_D^{20} -5,7^\circ$ (с 1, CH_3OH)).

Woc-Gly-OEt. ^1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 1,2 (3H, м, CH_3), 1,4 (9H, с, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$), 3,85 (2H, м, CH_2), 4,2 (2H, м, OCH_2CH_3), 5,0 (1H, с, NH).

Z-Phe-OEt. ^1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 1,15 (3H, м, CH_3), 3,1 (2H, м, CH_2), 4,2 (2H, м, OCH_2CH_3), 4,7 (1H, м, CH), 5,1 (2H, с, CH_2), 5,2 (1H, д, NH), 7,3—7,4 (10H, м, 2 C_6H_5); $[\alpha]_D^{20} +9,5 \pm 0,5^\circ$ (с 1, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 1 : 1).

Z-Gly-OEt. ^1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 1,2 (3H, м, CH_3), 3,9 (2H, д, CH_2), 4,2 (2H, м, OCH_2CH_3), 5,1 (2H, с, CH_2), 5,2 (1H, д, NH), 7,3 (5H, м, C_6H_5).

трет-Бутиловый эфир трет-бутилоксикарбонилфенилаланил-лейцина (XIX). а) *Ферментативный синтез.* К раствору 0,069 г (0,23 ммоль) этилового эфира Woc-Phe-OH в 0,5 мл DMF прибавляли 0,5 мл 0,2 М К-фосфатного буфера (рН 8,5), 0,065 мл (0,46 ммоль) триэтиламина, 0,105 г (0,46 ммоль) $\text{HCl} \cdot \text{H-Leu-OBu}^t$, затем при интенсивном перемешивании 25 мг α -химотрипсина, выдерживали 1,5 ч при 20° С. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе бензол — гептан — ацетон, 5 : 2 : 2. Реакционную массу экстрагировали этилацетатом (4×5 мл). Органический слой промывали 10% лимонной кислотой (3×5 мл), водой (3×5 мл), 5% раствором NaHCO_3 (3×5 мл), насыщенным раствором NaCl (3×5 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали. Продукт выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ. Выход 0,073 г (72%); т. пл. 127—130° С; R_f 0,7 (бензол — гептан — ацетон, 5 : 2 : 2); $[\alpha]_D^{20} -19,5 \pm 0,5^\circ$ (с 1, CH_3OH); ^1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0,85 (6H, м, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,4 (9H, с, $(\text{CH}_3)_3$), 1,45 (9H, с, $(\text{CH}_3)_3$), 1,6—1,65 (3H, м, CHCH_2), 3,05 (2H, д, CH_2), 4,3 (1H, м, CH), 4,4 (1H, м, CH), 5,0 (1H, м, NH), 6,25 (1H, д, NH), 7,2 (5H, м, C_6H_5); ВЭЖХ, градиентное элюирование от 100% системы А до 100% системы Б за 20 мин, скорость потока 5 мл/мин, время удерживания 15 мин.

б) *Химический синтез.* К раствору 0,15 г (0,56 ммоль) Woc-Phe в 2 мл DMF при перемешивании и охлаждении до 0° С прибавляли 0,145 г (1,06 ммоль) НОВТ и 0,13 г (0,6 ммоль) DCC. Через 30 мин прибавляли 0,059 мл (0,53 ммоль) N-метилморфолина и 0,12 г (0,53 ммоль) $\text{HCl} \cdot \text{H-Leu-OBu}^t$. Перемешивали 1 ч при 0° С, затем ночь при 20° С. Отфильтровывали выпавшую дициклогексилмочевину, промывали на фильтре этилацетатом. Органический слой промывали 5% раствором NaHCO_3 (3×5 мл), водой (3×5 мл), 10% лимонной кислотой (3×5 мл), насыщенным раствором NaCl (3×5 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали, досушивали в вакууме. Продукт выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ (условия см. пункт «а»). Выход 0,125 г (54%); R_f 0,7 (бензол — гептан — ацетон, 5 : 2 : 2); т. пл. 128—130° С; $[\alpha]_D^{20} -19,5 \pm 0,5^\circ$ (с 1, CH_3OH); ВЭЖХ, время удерживания 14,8 мин; ^1H -ЯМР-спектр — см. пункт «а».

трет-Бутиловый эфир N-бензилоксикарбониллейцил-фенилаланина (XXI). К раствору 0,053 г (0,191 ммоль) метилового эфира N-бензилоксикарбониллейцина в 0,3 мл метанола прибавляли 0,018 г (0,07 ммоль) $\text{HCl} \cdot$

· Н-Рhe-OBu', затем 0,7 мл буферного раствора, содержащего 0,2 М KH_2PO_4 , 0,2 М EDTA, 0,4 М меркаптоэтанол (рН 9, установлен с помощью 2 М КОН). Затем при интенсивном перемешивании прибавляли 10 мг (0,4 мкмоль) папаина. Ферментативную реакцию останавливали через определенные промежутки времени (30, 60, 120, 180 мин) добавлением 1 мл 10% лимонной кислоты. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (4×5 мл). Органический слой отделяли и сушили Na_2SO_4 . Растворитель удаляли, остаток растворяли в 5 мл ацетонитрила и анализировали с помощью аналитической ВЭЖХ (см. рис. 1). Выход 0,023 г (70%) (через 180 мин); т. пл. 111—113° С; R_f 0,53 (бензол — гептан — ацетон, 5 : 2 : 2); $[\alpha]_D^{20} +13 \pm 0,5^\circ$ (с 1, CHCl_3); ^1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0,9 (6H, м, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,4 (9H, с, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,6—1,65 (3H, м, CHCH_2), 3,1 (2H, д, CH_2), 4,2 (1H, м, CH), 4,7 (1H, м, CH), 5,1 (2H, с, CH_2OCO), 5,15 (1H, с, NH), 6,4 (1H, д, NH), 7,1—7,3 (10H, м, 2 C_6H_5); ВЭЖХ, система В, скорость потока 0,8 мл/мин, время удерживания 5 мин.

N-Бензилоксикарбонилглицил-лейцил-фенилаланин (XXIV). а) Ферментативный синтез. В 1 мл буферного раствора, содержащего 0,2 М KH_2PO_4 , 0,2 М EDTA, 0,05 М меркаптоэтанол (рН 8,1, установлен с помощью 2 М КОН), вносили 0,095 г (0,39 ммоль) этилового эфира Z-глицина (XXIII), 0,046 г (0,23 ммоль) бромгидрата лейцил-фенилаланина (XXII) (полученного из Z-Leu-Phe-OBu' (XXI) обработкой 2 н. НВг в уксусной кислоте с последующим осаждением из эфира), 0,19 мл (0,13 ммоль) триэтиламина, 0,4 мл метанола. Затем при интенсивном перемешивании суспензии добавляли 10 мг (0,4 мкмоль) папаина, растворенного в 1 мл буферного раствора, и выдерживали при 20° С. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол, 9 : 1. Через 1,5 ч реакционную массу подкисляли 0,1 н. HCl до pH 3, экстрагировали этилацетатом (4×5 мл), органический слой промывали насыщенным раствором NaCl (3×7 мл), упаривали. Продукт выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ. Выход 0,024 г (40%); т. пл. 151—152° С; R_f 0,66 (хлороформ — метанол, 9 : 1); $[\alpha]_D^{20} -10 \pm 0,5^\circ$ (с 1, CH_3OH); ^1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0,9 (6H, м, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,5—1,56 (3H, м, CHCH_2), 3,1 (2H, м, CH_2), 3,7 (2H, д, CH_2), 4,45—4,5 (2H, м, 2 CH), 5,1 (2H, с, CH_2OCO), 7,3—7,45 (10H, м, 2 C_6H_5) ($\text{DMSO}-d_6$); ВЭЖХ, градиентное элюирование от 100% системы А до 100% системы Б за 20 мин, скорость потока 5 мл/мин, время удерживания 10 мин.

б) Химический синтез аналога (XVII). 0,184 г (0,035 ммоль) Z-Gly*-Leu-Phe-OBu' (VI), полученного из Z-Gly*-Leu-OH и HCl·H-Phe-OBu' DCC/НОВТ-методом с выходом 68%, растворяли в 1 мл 50% трифторуксусной кислоты в хлористом метиле. Через 1 ч удаляли растворитель, остаток несколько раз упаривали и растирали с эфиром, сушили. Выход 0,159 г (96%); т. пл. 150—152° С; R_f 0,65 (хлороформ — метанол, 9 : 1); $[\alpha]_D^{20} -10 \pm 0,5^\circ$ (с 1, CH_3OH); ^1H -ЯМР-спектр см. пункт «а» (отсутствует сигнал от CH_2 -группы глицина — 3,7 м. д.).

N-Стеароилглицил-лейцин (III). К охлажденной до -15° С суспензии 0,039 г (0,3 ммоль) лейцина и 0,025 г (0,3 ммоль) NaHCO_3 в 3 мл 50% водного диоксана добавляли 0,065 г (0,15 ммоль) оксисукцинимидного эфира *N*-стеароилглицина (полученного из *N*-стеароилглицина [7] и *N*-гидроксисукцинимид DCC-методом с выходом 72%) и перемешивали 1 ч при 0° С и 20 ч при 20° С. Затем смесь подкисляли 1 н. HCl до pH 2—3 и экстрагировали этилацетатом (3×5 мл). Органический слой промывали 0,1 н. HCl (3×5 мл), водой (3×5 мл), 5% NaHCO_3 (3×5 мл), насыщенным раствором NaCl (3×5 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали. Остаток перекристаллизовывали из тетрагидрофурана. Выход 0,08 г (59%); т. пл. 103—105° С; R_f 0,69 (хлороформ — ацетон — метанол, 4 : 1 : 1); $[\alpha]_D^{20} -3,5 \pm 0,5^\circ$ (с 1, CHCl_3 — CH_3OH , 1 : 1).

трет-Бутиловый эфир *N*-стеароилглицил-лейцил-фенилаланина (VII). Раствор 0,053 г (0,12 ммоль) *N*-стеароилглицил-лейцина (III) в 1 мл DMF охлаждали до 0° С и при перемешивании прибавляли 0,03 г (0,22 ммоль) НОВТ и 0,027 г (0,13 ммоль) DCC. Через 30 мин прибавляли 0,012 мл

(0,11 ммоль) N-метилморфолина и 0,029 г (0,11 ммоль) $\text{HCl} \cdot \text{H-Phe-OBu}^t$. Перемешивали 1 ч при охлаждении, затем ночь при 20° С. Реакционную массу разбавляли этилацетатом, отфильтровывали дициклогексилмочевину, маточник промывали насыщенным раствором NaCl (3×5 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали, остаток досушивали в вакууме. Продукт выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ. Выход 0,058 г (78%); т. пл. 82—84° С; R_f 0,63 (хлороформ — ацетон — метанол, 8 : 1 : 1), 0,25 (хлороформ — ацетон — метанол, 18 : 1 : 1); $[\alpha]_D^{20} +9 \pm 0,5^\circ$ (с 1, CHCl_3); ^1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0,9 (9H, м, CH_3 ; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,25 (28H, м, $(\text{CH}_2)_{14}$), 1,4 (9H, с, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,6 (3H, м, CHCH_2), 2,2 (2H, т, CH_2CO), 3,1 (2H, м, CH_2), 3,9 (2H, м, CH_2), 4,4 (1H, м, CH), 4,7 (1H, м, CH), 6,2 (1H, т, NH), 6,5 (2H, дд, 2NH), 7,15 (5H, м, C_6H_5); ВЭЖХ, градиентное элюирование от 100% А до 100% Б за 20 мин, скорость потока 5 мл/мин, время удерживания 18 мин.

N-Стеароилглицил-лейцил-фенилаланин (XIII) был получен из 0,044 г соединения (VII) обработкой 50% трифторуксусной кислотой в хлористом метиле с последующим осаждением из эфира. Выход 0,031 г (76%); $[\alpha]_D^{20} -15,5 \pm 0,5^\circ$ (с 1, CH_3OH).

Октадециловый эфир трет-бутилоксикарбонилглицил-лейцил-фенилаланина (IX). Раствор 0,048 г (0,17 ммоль) трет-бутилоксикарбонилглицил-лейцина в 1 мл DMF охлаждали до 0° С, прибавляли при перемешивании 0,043 г (0,3 ммоль) НОВТ и 0,04 г (0,19 ммоль) DCC. Через 30 мин прибавляли 0,017 мл (0,16 ммоль) N-метилморфолина и 0,08 г (0,16 ммоль) бромгидрата октадецилового эфира фенилаланина. Перемешивали при охлаждении 1 ч и при 20° С в течение ночи. Затем отфильтровывали дициклогексилмочевину, промывали на фильтре этилацетатом. Маточник промывали 10% лимонной кислотой (3×5 мл), водой (3×5 мл), 5% раствором NaHCO_3 (3×5 мл), насыщенным раствором NaCl (3×5 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали. Продукт выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ. Выход 0,068 г (61%); т. пл. 53—55° С; R_f 0,86 (хлороформ — ацетон — метанол, 8 : 1 : 1), 0,56 (хлороформ — ацетон — метанол, 18 : 1 : 1); $[\alpha]_D^{20} -20,5 \pm 0,5^\circ$ (с 1, $\text{CHCl}_3\text{—CH}_3\text{OH}$, 1 : 1); ^1H -ЯМР-спектр, δ , м. д.: 0,9 (9H, м, CH_3 , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,25 (30H, м, $(\text{CH}_2)_{15}$), 1,45 (9H, с, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$), 1,6—1,65 (5H, м, CHCH_2 , OCH_2CH_2), 3,1 (2H, м, CH_2), 3,7 (2H, м, CH_2), 4,1 (2H, т, OCH_2CH_2), 4,45 (1H, м, CH), 4,8 (1H, м, CH), 5,2 (1H, м, NH), 6,65 (2H, м, 2NH), 7,1 (5H, м, C_6H_5); ВЭЖХ, 65% системы Б в системе А (по объему) — 14 мин, 75% системы Б в системе А (по объему) — 10 мин, скорость потока 10 мл/мин, время удерживания 18,3 мин.

Трифторацетат октадецилового эфира глицил-лейцил-фенилаланина (XV) получали обработкой 0,04 г соединения (IX) 50% трифторуксусной кислотой в хлористом метиле с последующим осаждением из эфира. Выход 0,036 г (89%).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Berthou J., Migliore-Samour D., Lifchitz A., Delettré J., Floc'h F., Jollés P. // FEBS Lett. 1987. V. 218. P. 55—58.
- Bosch M. L., Earl P. L., Fargnoli K., Picciafuoco S., Giombini F., Wong-Staal F., Franchini G. // Science. 1989. V. 244. № 12. P. 694—697.
- Lobl T. J., Renis H. E., Eppand R. M., Maggiora L. L., Wathen M. W. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1988. V. 32. P. 326—330.
- Звонкова Е. Н., Хабарова Е. И., Есипова О. В., Канярза Т. И. // Журн. общей химии. 1988. Т. 58. № 10. С. 2392—2396.
- Хабарова Е. И., Дубовский П. В., Василенко И. А., Звонкова Е. Н., Гусев Д. Г., Огрель А. А. // Биол. мембраны. 1989. Т. 6. № 4. С. 378—385.
- Есипова О. В., Хабарова Е. И., Звонкова Е. Н. // Всес. симпозиум по химии пептидов. Тез. докл. Рига, 1990. С. 97.
- 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.
- Запсвалова Н. П., Горбунцова Е. Ю., Митч Ю. В. // Бюэрган. химит. 1985. Т. 11. № 6. С. 733—737.
- Barbas C. F., Matos J. R., West J. B., Wong C. H. // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 5162—5166.
- Cantacuzene D., Pascal F., Guerreiro C. // Tetrahedron. 1987. V. 43. № 8. P. 1823—1826.

11. Martinek K., Semenov A. N., Berezin I. V. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 658. № 1. P. 76—89.
12. Martinek K., Semenov A. N. // J. Appl. Biochem. 1981. V. 3. № 1. P. 93—126.
13. Morihara K. // Trends Biotechnol. 1987. V. 5. № 1. P. 164—170.
14. Mitin Yu. V., Zapevalova N. P., Gorbunova E. Yu. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1984. V. 23. № 5. P. 528—534.

Поступила в редакцию
29.I.1991

O. V. ESIPOVA, S. V. EREMIN, E. N. ZVONKOVA

SYNTHESIS OF TRIPEPTIDE GLCYL-*L*-LEUCYL-*L*-PHENYLALANINE
AND ITS ANALOGUES

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

Peptide Gly-*L*-Leu-*L*-Phe and its derivatives were synthesized by the C-end elongation utilizing DCC/HOBT technique and by enzymatic route with the help of papain using esters of N-benzyloxycarbonyl-glycine and -*L*-leucine as acyl donors have been suggested. The chemical, similarly to the enzymatic, synthesis was not accompanied by racemization. Conditions for HPLC separation and preparative isolation of the enzymatic reaction products were developed.