

Синтез диметилового эфира N^{60} -Pbf-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты

А.М. Дёмин,^{*1} М.А. Макаренко²

¹ Институт органического синтеза УрО РАН им. И.Я. Постовского, 620041, Екатеринбург, ул. С. Ковалевской/Академическая, 22/20. E-mail: demin@ios.uran.ru
² Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, 620002, Екатеринбург ул. Мира, 19

Проведена оптимизация метода синтеза диметилового эфира (N^{60} -2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты при использовании методов пептидной химии в растворе. Общий выход целевого трипептида составил 30%.

Введение

В настоящее время при разработке новых медицинских препаратов всё большее внимание уделяют их адресной доставке в необходимые типы тканей. Например, при конструировании препаратов для лечения рака используют так называемые молекулярные вектора – биомолекулы, обеспечивающие адресную доставку и удержание препарата в опухоли. Одним из перспективных является семейство RGD-пептидов, к которому относят линейные и циклические пептиды, содержащие в своей структуре последовательность аминокислот L-Arg-Gly-L-Asp¹. Ранее нами был описан синтез ряда производных RGD-пептида^{2,3}.

Целью данной работы является оптимизация метода синтеза диметилового эфира (N^{60} -2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (N^{60} -Pbf, N^{α} -Fmoc-L-Arg-Gly-L-Asp(OMe)₂) при использовании методов пептидной химии в растворе.

Результаты и обсуждение

Синтез проводили с использованием классических методов в растворе путем последовательного наращивания пептидной цепи, начиная с С-конца, исходя из диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты (L-Asp(OMe)₂).

Функциональные группы пептида были выбраны таким образом, чтобы обеспечить возможность его связывания с другими биомолекулами или материалами (например, с поверхностью магнитных наночастиц, квантовых точек и др.) с использованием α -аминогруппы L-аргинина.

Обязательным условием сохранения специфичности RGD-пептидов в отношении опухолевых клеток является наличие свободной гуанидиновой группы остатка аргинина и γ -карбоксовой группы аспарагиновой кислоты. Это необходимо для сохранения специфичности пептида в отношении поверхностных рецепторов раковых клеток, с которыми в дальнейшем смогут связываться RGD-модифицированные диагностические или терапевтические агенты.

На первом этапе работы проводили синтез N-защищённого диметилового эфира глицил-аспарагиновой кислоты (Gly-L-Asp(OMe)₂) (Рис. 1). В качестве N-защищённых производных глицина нами были использованы (*N*-флуоренилметоксикарбонил)глицин (Fmoc-Gly-OH) и *N*-(*m*pe*m*-бутилоксикарбонил)глицин (Boc-Gly-OH).

Конденсацию Fmoc-Gly-OH **1** с L-Asp(OMe)₂ **3** осуществляли хлорангидридным методом (Рис. 1). Для этого изначально нами был получен с количественным выходом хлорангидрид (*N*-флуоренилметоксикарбонил)глицина

(Fmoc-Gly-Cl, **2**), который использовали в дальнейшем для синтеза дипептида **4** без дополнительной очистки. Целевой дипептид (Fmoc-Gly-L-Asp(OMe)₂, **4**) был легко выделен в чистом виде путём перекристаллизации с выходом 73%.

Конденсация Voc-Gly-OH с L-Asp(OMe)₂ проведена при использовании 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил] карбодимида (EDC) или тетрафторбората *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурия (ТВТУ) [2]. Дипептид (Voc-Gly-L-Asp(OMe)₂, **6**) был получен в виде масла и был выделен в чистом виде методом флеш-хроматографии с выходом в первом случае 24 %, а во втором 70 %.

Для проведения дальнейшей конденсации с L-(*N*^ω-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил-*N*^α-флуоренилметокси-карбонил)аргинином (*N*^ω-Pbf,*N*^α-Fmoc-L-Arg-OH, **8**) было проведено деблокирование аминогруппы дипептидов Fmoc-Gly-L-Asp(OMe)₂ и Voc-Gly-L-Asp(OMe)₂ (Рис. 1).

В первом случае удаление Fmoc-группы проводили по стандартным методикам при использовании 20% пиперидина в

хлористом метиле или метаноле. Однако в обоих случаях целевого продукта в чистом виде выделить не удалось. Почти количественно (94%) происходило образование циклического продукта – метилового эфира 2-(3,6-диоксопиперазин-2-ил)уксусной кислоты **5** путём конденсации аминогруппы глицина с α-карбоксетильной группой аспарагиновой кислоты. Поэтому диметилловый эфир глицил-L-аспарагиновой кислоты (Gly-L-Asp(OMe)₂) получить исходя из Fmoc-Gly-Asp(OMe)₂ не удалось (в реакционной массе менее 10%).

Удаление Voc-группы проводили действием концентрированной трифторуксусной кислотой на раствор Voc-Gly-L-Asp(OMe)₂ **6** в хлористом метиле (Рис. 2). Контроль хода реакции проводили по данным ТСХ. Показано, что целевой продукт образуется в чистом виде (с выходом 98%), примеси исходного соединения исчезают уже через 1 ч после начала реакции. Выделенный продукт использовали в дальнейшем для синтеза трипептида *N*^ω-Pbf,*N*^α-Fmoc-L-Arg-Gly-Asp(OMe)₂ **9** без дополнительной очистки.

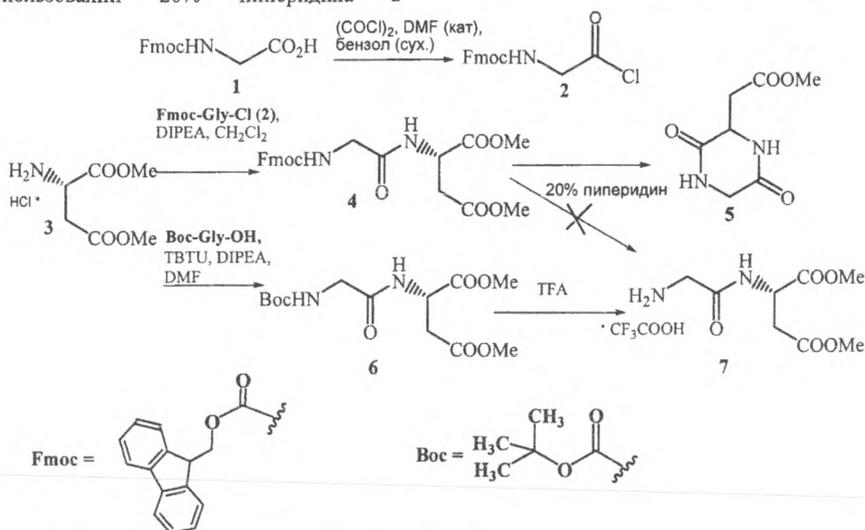


Рис. 1. Схема синтеза дипептида Gly-L-Asp(OMe)₂

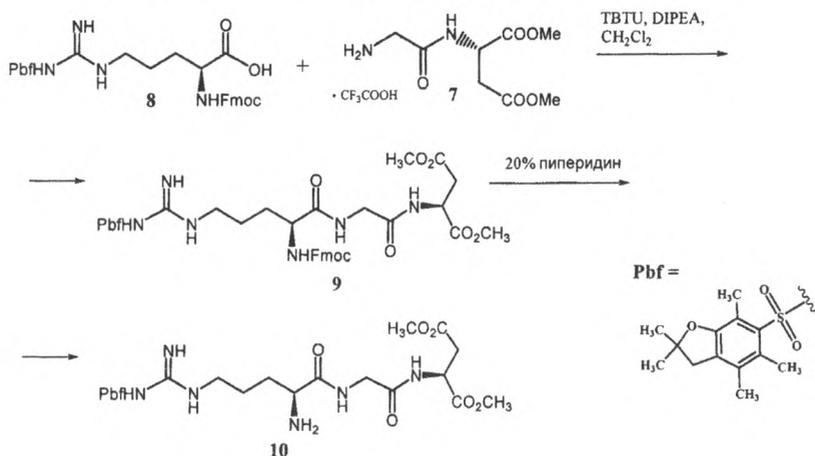


Рис. 2. Схема синтеза трипептида N^0 -Pbf-L-Arg-Gly-L-Asp(OMe)₂

Путем конденсации дипептида 7 с N^0 -Pbf, N^{α} -Fmoc-L-Arg-OH при использовании TBUTU синтезирован защищённый трипептид N^0 -Pbf, N^{α} -Fmoc-L-Arg-Gly-Asp(OMe)₂ 9 (Рис. 2).

Селективное удаление защитной Fmoc-группы в трипептиде гладко протекало под действием пиперидина в хлористом метиле с образованием трипептида (Рис. 2). Целевой трипептид (N^0 -Pbf-L-Arg-Gly-Asp(OMe)₂) 10 выделяли методом флеш-хроматографии с выходом 56 %.

В работе [2] был описан аналогичный синтез данного соединения с выходом 32.5%, однако не все выходы промежуточных соединений указаны для аналитически чистых веществ.

В данной работе проведена оптимизация метода синтеза трипептида N^0 -Pbf-L-Arg-Gly-Asp(OMe)₂. Общий выход целевого трипептида составил 30 % с учётом получения на каждой стадии синтеза аналитически чистых продуктов. В перспективе данный трипептид будет использован для иммобилизации на магнитные наночастицы с целью получения нанокomпозитных материалов, потенциальных в качестве контрастных агентов для МРТ для диагностики рака.

Экспериментальная часть

Диметилловый эфир L-аспаргиновой кислоты, гидрохлорид и *N*-(*mpem*-бутилоксикарбонил)глицин получали по известным методикам. Использовали EDC×HCl, TBUTU (Fluka), DIPEA (ICN Biomedical Inc.), N^0 -Pbf, N^{α} -Fmoc-L-Arg-OH (Aldrich).

Спектры ЯМР регистрировали на приборе Bruker DRX400 (Германия, 400 МГц для ¹H, 376 МГц для ¹⁹F) и на приборе Bruker Avance 500 (Германия, 500 МГц для ¹H) в DMSO d₆ с SiMe₄ в качестве внутреннего стандарта при комнатной температуре. Элементный анализ образцов проводили на автоматическом CHN-анализаторе Perkin Elmer PE 2400, серия II. Для флеш-хроматографического разделения использовали силикагель Silica gel 60 0.040–0.063 мм (AlfaAesar).

Для обращёнофазовой ВЭЖХ использовали хроматограф Agilent 1100, колонка “Kromasil 100-5C 18” (детектирование при длинах волн 220 или 254 нм) или “Phenomenex Luna C-18” (детектирование по светорассеянию), 250×4.6 мм, 5 мкм, скорость элюирования 0.8 мл/мин.

Для ТСХ использовали пластинки Sorbfil (ООО "Имид", Россия), пептиды проявляли в УФ свете, парааминоа и 0.2% раствором нингидрина в ацетоне.

Библиографический список

1. D. J. Welsh, D. K. Smith, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 4795.

2. A. Yu. Vigorov, A. M. Demin, I. A. Nizova, V. P. Krasnov, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **2014**, *40* (2), 142.
3. A. M. Demin, A. Y. Vigorov, I. A. Nizova, M. A. Uimin, N. N. Shchegoleva, A. E. Ermakov, V. P. Krasnov, V. N. Charushin, *Mendeleev Commun.*, **2014**, *24*, 20.