

УДК 547.855:615.372

Хкимзода Парвина Убайдулло

Таджикский государственный педагогический университет
имени Садриддин Айни, г. Душанбе, Таджикистан

Хкимзода Парвина Убайдулло

Садриддин Айни атындагы
Тажик мамлекеттик педагогикалык университети
Душанбе, Таджикистан

Khkimzoda Parvina Ubaidullo

Tajik State Pedagogical University
named after Sadriddin Aini, Dushanbe, Tajikistan

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ ТРИПЕПТИДА Н-АЛА-ЛЕУ-ГЛЮ-ОН МЕТО- ДОВ СМЕШАННЫЕ АНГИДРИДЫ И АКТИВИРОВАННЫЕ ЭФИРЫ

АРАЛАШ АНГИДРИДДЕРДИ ЖАНА АКТИВДЕШТИРИЛГЕН ЭФИРЛЕРДИ КОЛДОНУУ МЕНЕН Н-АЛА-ЛЕУ-ГЛЮ-ОН ТРИПЕПТИДИН СИНТЕЗДӨӨНҮН ТЕХНОЛОГИЯЛЫК ЫКМАЛА- РЫ

TECHNOLOGICAL APPROACHES TO THE SYNTHESIS OF TRIPEPTIDE H-ALA-LEU-GLY-ON METHODS MIXED ANHYDRIDE AND ACTIVATED ESTER

Аннотация. В работе проведено детальное исследование методов синтеза трипептида H-Ala-Leu-Gly-OH, представляющего интерес как модельное соединение для изучения процессов пептидной конденсации и получения биологически активных олигопептидов. Основное внимание уделено применению метода смешанных ангидридов, при котором в качестве конденсирующего реагента используется этилхлорформиат. Данный метод позволяет эффективно активировать карбоксильную группу и обеспечивает высокую степень селективности взаимодействия с аминокомпонентом.

Кроме того, в работе подробно описан альтернативный метод синтеза трипептида - метод активированных эфиров, в частности пентафторэтиловых производных. Преимуществом этого подхода является высокая реакционная способность получаемых активированных соединений. Существенная технологическая особенность заключается в том, что активированные эфиры не выделялись в индивидуальном виде, а вводились непосредственно в стадию конденсации после удаления дициклогексилмочевины простым фильтрованием. Такой приём позволяет значительно сократить число промежуточных операций, уменьшить временные затраты и минимизировать возможные потери вещества.

Проведённый анализ показал, что использование пентафторэтиловых эфиров без их выделения в чистом виде способствует упрощению технологического процесса и повышению его общей эффективности. Полученные результаты подтверждают перспективность сочетания двух методов — смешанных ангидридов и активированных эфиров — при синтезе коротких пептидов, что может быть полезным как в исследовательской практике, так и при разработке новых подходов к получению биологически активных соединений.

Ключевые слова: трипептид, H-Ala-Leu-Gly-OH, синтез пептидов, метод смешанных ангидридов, этилхлорформиат, активированные эфиры, пентафторэтиловые эфиры, дициклогексилмочевина.

Аннотация. Бул макалада пептидик конденсация процесстерин жана биологиялык активдүү олигопептиддерди өндүрүүнү изилдөө үчүн моделдик кошулма катары кызыктуу болгон H-Ala-Leu-Gly-OH трипептидин синтездөө ыкмаларынын кеңири изилдөөсү берилген. Конденсациялоочу реагент катары этилхлорформатты колдонгон аралаш ангидрид ыкмасын колдонууга басым жасалат. Бул ыкма карбоксил тобун натыйжалуу активдештирет жана

аминокомпонент менен өз ара аракеттенүүдө жогорку деңгээлдеги селективдүүлүктү камсыз кылат.

Андан тышкары, макалада трипептидди синтездөөнүн альтернативдүү ыкмасы - активдештирилген эфирлердин, атап айтканда, пентафторэтил туундуларынын ыкмасы кеңири баяндалат. Бул ыкманын артыкчылыгы - алынган активдештирилген кошулмалардын жогорку реактивдүүлүгү. Технологиялык жактан маанилүү артыкчылыгы - активдештирилген эфирлер өзүнчө бөлүнүп алынбай, жөнөкөй чыпкалоо аркылуу дициклогексилмочевинаны алып салгандан кийин түз конденсация этабына киргизилген. Бул ыкма аралык кадамдардын санын бир топ азайтат, убакыт чыгымдарын азайтат жана заттын мүмкүн болгон жоготуусун минималдаштырат. Анализ көрсөткөндөй, пентафторэтил эфирлерин таза түрүндө бөлүп албастан колдонуу процессти жөнөкөйлөтүп, анын жалпы натыйжалуулугун жогорулатат. Жыйынтыктар кыска пептиддерди синтездөөдө эки ыкманы — аралаш ангидриддерди жана активдештирилген эфирлерди — айкалыштыруунун потенциалын тастыктайт, бул изилдөөлөрдө да, биологиялык активдүү кошулмаларды алуунун жаңы ыкмаларын иштеп чыгууда да пайдалуу болушу мүмкүн.

Ачкыч сөздөр: трипептид, H-Ala-Leu-Gly-OH, пептиддик синтез, аралаш ангидрид ыкмасы, этилхлорформат, активдештирилген эфирлер, пентафторэтил эфирлери, дициклогексилмочевина.

Abstract. This paper presents a detailed study of methods for synthesizing the tripeptide H-Ala-Leu-Gly-OH, which is of interest as a model compound for studying peptide condensation processes and the production of biologically active oligopeptides. The focus is on the application of the mixed anhydride method, which utilizes ethyl chloroformate as the condensing reagent. This method effectively activates the carboxyl group and ensures a high degree of selectivity in the interaction with the amino component.

Furthermore, the paper describes in detail an alternative method for synthesizing the tripeptide—the method of activated esters, specifically pentafluoroethyl derivatives. The advantage of this approach is the high reactivity of the resulting activated compounds. A significant technological advantage is that the activated esters were not isolated individually, but were introduced directly into the condensation stage after removal of dicyclohexylurea by simple filtration. This approach significantly reduces the number of intermediate steps, decreases time costs, and minimizes potential loss of substance. The analysis showed that the use of pentafluoroethyl ethers without their isolation in pure form simplifies the process and increases its overall efficiency. The results confirm the potential of combining two methods—mixed anhydrides and activated esters—in the synthesis of short peptides, which could be useful both in research and in the development of new approaches to obtaining biologically active compounds.

Keywords: tripeptide, H-Ala-Leu-Gly-OH, peptide synthesis, mixed anhydride method, ethyl chloroformate, activated esters, pentafluoroethyl ethers, dicyclohexylurea.

Введение. Пептидные препараты занимают все большее место среди других лекарственных препаратов. Об этом свидетельствует динамика роста реализации их в США. В 2010 году выпуск и реализации пептидных препаратов равнялось 13 миллиардам долларов, в 2020 году рынок пептидов оценивался в 23 миллиарда долларов США с прогнозируемым ростом до 57 миллиардов долларов США к 2027 году [1-4]. Следовательно, возрастает интерес к методам их синтеза. Особенно к методам синтеза в растворе, поскольку он занимает ведущее поло-

жение в синтезе низкомолекулярных пептидов и их модификаций [5-7].

Пептидный синтез занимает одно из ключевых мест в современной органической и биологической химии, поскольку пептиды играют фундаментальную роль в регуляции физиологических процессов, служат модельными соединениями для изучения структуры белков и широко применяются в фармацевтической промышленности. Особое значение имеет разработка эффективных и экономичных методов получения олигопептидов, которые обеспечивают высокую

чистоту целевых продуктов и минимизацию количества побочных веществ. Среди доступных методов синтеза заметное место занимают способы с использованием смешанных ангидридов, а также подходы, основанные на формировании активированных эфиров, которые позволяют достичь высокой степени селективности конденсации аминокислотных остатков.

Настоящая работа посвящена получению трипептида H-Ala-Leu-Gly-OH с использованием методов смешанных ангидридов и активированных пентафторэтиловых эфиров, а также стандартизации экстракта моркови по основным физико-химическим и биологически значимым показателям. Кроме того, целью исследования является создание композиции на основе трипептида и растительного экстракта и оценка её токсикологических характеристик. Результаты проведённой работы могут иметь значение для разработки новых биологически активных препаратов и исследовательских моделей в области биохимии и фармацевтической технологии.

Цель работы. Целью исследования является разработка и экспериментальная оценка эффективных методов синтеза трипептида H-Ala-Leu-Gly-OH с применением методов смешанных ангидридов и активированных эфиров, а также определение технологических преимуществ и ограничений каждого из подходов.

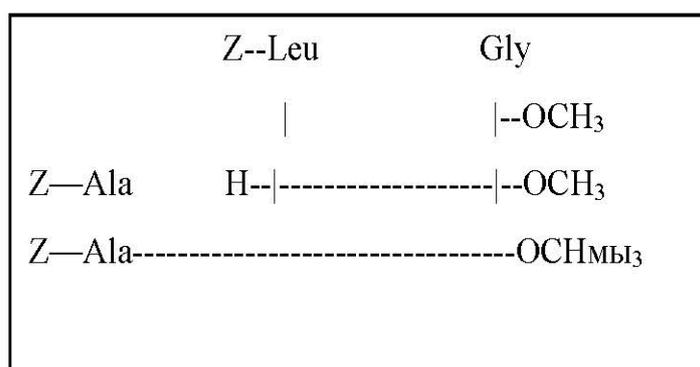
Материалы и методы. Синтез пептидов методом смешанных ангидридов. 10 ммоль карболсильного компонента растворяют в 10 мл ДМФА, охлаждают до -10°C и добавляют 10 ммоль этилхлорформиата и 10 ммоль N -метилморфолина. Через 2 мин добавляют раствор 10 ммоль аминокомпонента в 5 мл

ДМФА. Перемешивали 2 часа при охлаждении и в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в этилацетате и обрабатывали кислыми и основными реагентами. Продукт осаждали из подходящего растворителя.

Синтез пептидов методом активированных эфиров. 10 ммоль трифторацетиламиннокислоты растворили в 10 мл этилацетата, охлаждали до -10°C , добавляли 10,5 ммоль ДЦГК, перемешивали 30 мин и добавляли 10 ммоль пентафторэтанола и перемешивали 2 часа при охлаждении. Затем выпавшую ДЦГМ отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в ЭА и к нему добавляли 10,5 ммоль натриевой соли аминокомпонента и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем растворитель упаривали, остаток промывали эфиром. Продукт переосаждали из подходящего растворителя.

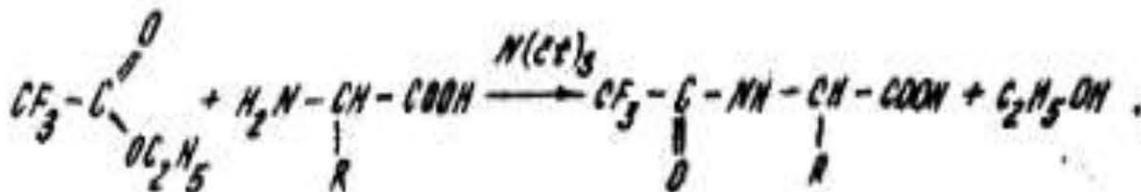
Обсуждение результатов

На первом этапе был получен дипептид Z-Leu-Gly-OCH_3 . Синтез был проведен методом смешанных ангидридов с использованием в качестве конденсирующего агента этилхлорформиата. Выход дипептида составил 90%. Действием бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте сималась карбобензоксигруппа и бромгидрат дипептида был получен с выходом 98%. На следующем этапе был получен трипептид $\text{Z-Ala-Leu-Gly-OCH}_3$ исходя из карбобензоксипептида и хлоргидрата дипептида также методом смешанных ангидридов. В качестве конденсирующего агента был использован этилхлорформиат. Выход трипептида составлял 85%. Таким образом общий выход защищенного трипептида $\text{Z-Ala-Leu-Gly-OCH}_3$ составлял 75%.



Затем по этой же схеме методом активированных пентафторфениловых эфиров был синтезирован этот же пептид. Только вместо

карбобензоксигруппы была использована трифторацетильная группа, которая была получена с помощью этилтрифторацетата.



На втором этапе было необходимо получить пентафторэтиловые эфиры, получаемые из пентафторэтанола $\text{CF}_3-\text{CF}_2-\text{OH}$. Мы предположили, что за счет фтора на α -углеродном атоме карбоксильной группы будет создаваться частичный положительный заряд, который будет активировать карбоксильную группу аминокислоты. Пентафторэтиловый эфир карбоксильного компонента был получен с помощью дициклогексилкарбодиимида и в реакцию конденсации вводился без выделения в чистом виде, сразу после отфильтровывания дициклогексилмочевины по схеме:

Карбоксильный компонент + ДЦГК + пентафторфенол \rightarrow

\rightarrow Активированный эфир + ДЦГМ \downarrow + аминокомпонент \rightarrow

\rightarrow дипептид + пентафторфенол

Дипептид получали после обычной обработки кислыми и основными реагентами и переосаждения из подходящего растворителя. Выход дипептида составил 72%, трипептида – 69%. Общий выход трипептида составил 49,7%.

Таким образом, новый активированный эфир не хуже других активированных эфиров, применяемых в пептидном синтезе, например *p*-нитрофениловых.

Далее было интересным проследить за тем, как влияет природа аминокислоты на выход дипептида, получаемого методом пентафторэтиловых эфиров.

Для этой цели в качестве карбоксильного компонента были использованы фенилаланин и *O*-Bzl-тирозин. В качестве аминокомпонента нами был использован метиловый эфир глицина.

Дипептид TFA-Phe-Gly-OCH₃ был получен с выходом 70%.

Дипептид TFA-Tyr(OBzl)-Gly-OMe был получен с выходом 66%.

Таким образом был сделан вывод о том, что у ароматических аминокислот за счет наличия фенольного кольца в боковой группе возникают стерические затруднения при активации карбоксильной группы и в реакции с аминокомпонентом.

Большое значение среди низкомолекулярных пептидов приобретают триптофансодержащие ди-, три- и тетрапептиды [13,14]. Синтез три- и тетрапептидов был проведен методом активированных пентафторфениловых эфиров с применением максимальной защиты наращиванием пептидной цепи с C-конца. Выход пептидов на стадиях конденсации аминокислот составлял 70-85%.

Трипептид определяли после раделения методом ТСХ на пластинках «Силуфол УФ-254» в системе *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:1) по сравнению со стандартом.

Вывод

В работе разработаны и исследованы два подхода к синтезу трипептида H-Ala-Leu-Gly-OH: метод смешанных ангидридов и метод активированных эфиров (пентафторэтиловых). Оба метода обеспечивают получение целевого соединения, однако выходы продуктов различаются: для метода смешанных ангидридов общий выход трипептида составил около 75%, тогда как для метода пентафторэтиловых эфиров — около 50%. Показано, что активированные пентафторэтиловые эфиры по эффективности не уступают традиционным активированным эфирным системам (например, *p*-нитрофениловым), хотя выходы зависят от структуры аминокислоты: ароматические аминокислоты дают более низкие выходы из-за стерических затруднений.

Дополнительно стандартизирован экстракт моркови, содержащий аминокислоты, флавоноиды и фенольные соединения, и создана композиция на основе трипептида и экстракта, не проявляющая токсичности.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования активированных эфиров и смешанных ангидридов для синтеза низкомолекулярных пептидов и расширяют возможности создания биологически активных композиций.

Литература

1. U.S. Food and Drug Administration (FDA): официальный сайт — URL: https://www.fda.gov/drugs/new_drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2021 (дата обращения 3 мая 2021).
2. U.S. Food and Drug Administration (FDA): официальный сайт — URL: https://www.fda.gov/drugs/new_drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2020 (дата обращения 3 мая 2021).
3. Beatriz G. de la Torre, Fernando Albericio. Peptide Therapeutics 2.0 // *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 2293 doi:10.3390/molecules25102293.
4. Vincent Martin, Peter H. G. Egelund, Henrik Johans son, Sebastian Thordal Le Quement, Felix Wojcik and Daniel Sejer Pedersen. Greening the synthesis of peptide therapeutics: an industrial perspective // *RSC Adv*. 2020 Vol. 10. P. 42457.
5. С. М. Филатова*, М. К. Гусева, Т. Г. Бодрова, Д. В. Паршина, У. А. Буданова, Ю. Л. Себякин Эволюционное развитие и структурное разнообразие природных антимикробных пептидов, пептидомиметиков и катионных амфифилов на основе аминокислот рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2021, т. LXV, № 2. -С.22-34;
6. Полянский М. А., Гинак А. И. Основные концепции синтеза пептидов как нового поколения биологически активных препаратов Известия СПбГТИ(ТУ) химия и химическая технология · органический синтез и биотехнология №58(84) 2021. -С.62-65;
7. Vasso Apostolopoulos, Joanna Bojarska, Tsun-Thai Chai, Sherif Elnagdy, Krzysztof Kaczmarek, John Matsoukas, Roger New, Keykavous Parang, Octavio Paredes Lopez, Hamideh Parhiz, Conrad O. Perera, Monica Pickholz, Milan Remko, Michele Saviano, Mariusz Skwarczynski, Yefeng Tang, Wojciech M. Wolf, Taku Yoshiya, Janusz Zabrocki, Piotr Zielenkiewicz, Maha AlKhazindar, Vanessa.