

СИНТЕЗ ПРОЛИЛПРОЛИНА

© 2019 г. В. А. Гайдукевич, Л. А. Попова, З. П. Зубрейчук, В. А. Книжников*

Институт физико-органической химии НАН Беларуси, 220072, Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова 13
*e-mail: knizh@ifoch.bas-net.by

Поступила в редакцию 31 января 2019 г.
После доработки 6 марта 2019 г.
Принята к публикации 15 марта 2019 г.

Пролилпролин получен как классическим пептидным синтезом с использованием *трет*-бутилоксикарбонильной или трифторацетильной аминоксигрупп и карбодиимидного метода образования пептидной связи, так и раскрытием дикетопиперазинового цикла октагидродипирроло[1,2-*a*:1',2'-*d*]пиразин-5,10-диона, полученного термоллизом метилового эфира пролина.

Ключевые слова: пролилпролин, октагидродипирроло[1,2-*a*:1',2'-*d*]пиразин-5,10-дион, *трет*-бутилоксикарбонильная и трифторацетильная аминоксигруппы, карбодиимидный метод.

DOI: 10.1134/S0514749219070164

Одним из возможных путей получения пептидов, содержащих в своем составе фрагменты из последовательности остатков одной и той же аминокислоты, является использование в качестве промежуточных соединений указанных фрагментов. Целью данной работы является выбор оптимального способа синтеза L-пролил-L-пролина **1**, который может быть использован в качестве исходного соединения для получения ряда физиологически активных пептидов [1–3].

Дипептид **1** был получен нами классическим пептидным синтезом с использованием как *трет*-бутилоксикарбонильной, так и трифторацетильной аминоксигрупп.

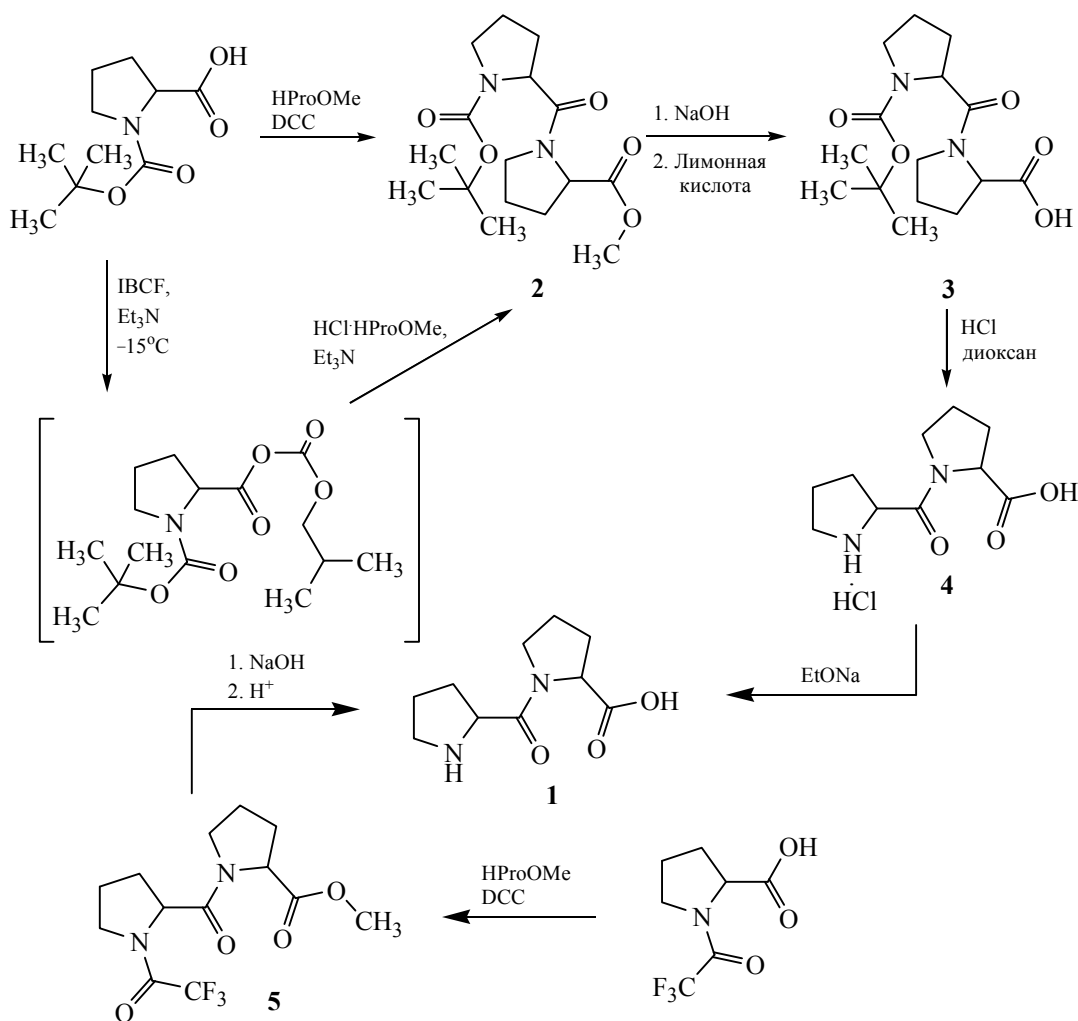
Конденсация *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-L-пролина с метиловым эфиром пролина под действием 1,3-дициклогексилкарбодиимида (DCC) привела к метил *N*-(*трет*-бутилоксикарбонил)-L-пролил-L-пролинату **2**, который также синтезирован с использованием модифицированной нами методики, описанной в [1], взаимодействием при низкой температуре смешанного ангидрида, полученного из *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-L-пролина и *изо*-бутилхлорформиата (IBCF), и вводимого в дальнейшие превращения без предварительного выделения из реакционной среды с метиловым эфиром L-пролина, образующимся при действии триэтиламина на гидрохлорид метилового эфира L-пролина. Обработка соединения **2** гидроксидом натрия и последующее подкисление

реакционной смеси лимонной кислотой привели к *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-пролину **3**, реакция которого с раствором хлористого водорода в диоксане давала гидрохлорид L-пролил-L-пролина **4**. Целевой дипептид **1** получен взаимодействием соединения **4** с эквимолярным количеством этилата натрия (схема 1).

Использование метил *N*-трифторацетил-L-пролил-L-пролинат в качестве исходного соединения для получения дипептида **1** позволило сократить количество стадий синтеза. Промежуточный *N*-трифторацетил-L-пролил-L-метоксипролин **5** был получен конденсацией *N*-трифторацетил-L-пролина с метиловым эфиром L-пролина под действием DCC. Одностадийное удаление защитных групп в соединении **5** под действием гидроксида натрия и подкисление реакционной смеси приводили к дипептиду **1** (схема 1).

Приведенные методы синтеза позволяют получать значительные количества дипептида **1**, но требуют значительных затрат разнообразных реактивов. В ходе исследования было установлено, что целевой дипептид удобно получать из октагидродипирроло[1,2-*a*:1',2'-*d*]пиразин-5,10-диона **6**, который образуется при термоллизе метилового эфира L-пролина. Термоллиз метил L-пролината проводили в среде кипящего диоксана или бутанола, либо без растворителя при температуре 105–110°C. Раскрытие дикетопиперазинового цикла соединения **6** под действием водного

Схема 1.



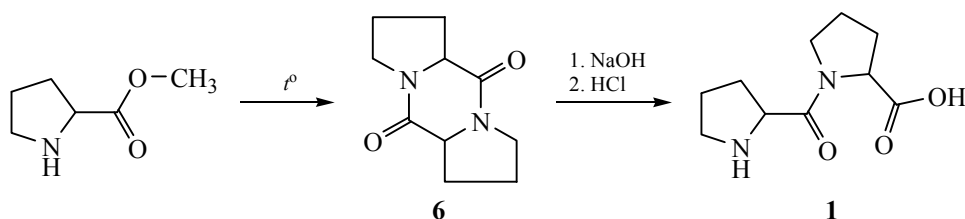
раствора гидроксида натрия и последующее подкисление реакционной смеси соляной кислотой привели к дипептиду **1** (схема 2).

Строение синтезированных соединений подтверждено данными ИК, ЯМР спектров и элементного анализа. В спектрах ЯМР соединений **1**, **2** и **3** наблюдается удвоение ряда сигналов, которое отмечалось для соединения **2** в работе [1] и может быть объяснено наличием пространственных изомеров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК спектры соединений записаны на ИК Фурье спектрофотометре Protégé-460 с приготовлением образцов в виде таблеток с KBr. Спектры ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C регистрировали на спектрометре Bruker Avance-500, химические сдвиги протонов измерены относительно сигналов остаточных протонов растворителей. Оптическую активность соединений измеряли на поляриметре ATAGO

Схема 2.



AP-300. Все операции проведены с использованием безводных органических растворителей. Метилловый эфир L-пролина получали обработкой гидрохлорида метилового эфира L-пролина, синтезированного по методике, описанной в [4], триэтиламино. Трифторацетильное и *трет*-бутилоксикарбонильные производные L-пролина получали по стандартным методикам [5, 6]. Выделенные из реакционных смесей промежуточные соединения использовали без дополнительной очистки.

L-Пролил-L-пролин (1). а. К раствору 7.46 г (30 ммоль) гидрохлорида L-пролил-L-пролина **4** в 30 мл этанола добавляли раствор, полученный взаимодействием 0.69 г (30 ммоль) натрия с 30 мл этанола. После перемешивания в течение 2 ч к реакционной смеси добавляли 10 мл хлороформа, выпавший осадок отфильтровывали и из полученного раствора растворитель удаляли при пониженном давлении. После переосаждения из этанола диэтиловым эфиром выход 4.52 г (71%), т.пл. 144–145°C, $[\alpha]_D^{20}$ –138.3° (с 1, H₂O). ИК спектр, ν , см⁻¹: 1654, 1612 (C=O). Спектр ЯМР ¹H (D₂O), δ , м.д.: 1.80–2.15 м, 2.20–2.35 м, 2.46–2.56 м (8H, 4CH₂), 3.32–3.50 м, 3.53–3.67 м (4H, 2CH₂), 4.18–4.32 м, 4.54–4.59 м (2H, 2CH). Спектр ЯМР ¹³C (D₂O), δ , м.д.: 22.15, 23.93, 24.00, 24.55, 28.12, 28.56, 29.31, 31.48, 46.51, 46.66, 47.39, 47.58, 59.03, 59.13, 61.88, 62.30, 167.24, 168.00, 178.35, 178.87. Найдено, %: С 56.33; Н 7.44; N 13.01. С₁₀H₁₆N₂O₃. Вычислено, %: С 56.59; Н 7.60; N 13.20.

б. К раствору 16.11 г (50 ммоль) метил *N*-трифторацетил-L-пролил-L-пролината **5** в 100 мл метанола добавляли раствор 4.4 г (110 ммоль) гидроксида натрия в 50 мл воды. После перемешивания в течение 20 ч к реакционной смеси по каплям добавляли раствор 1.14 г (10 ммоль) трифторуксусной кислоты в 10 мл воды и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растирали с 50 мл ацетона, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре ацетоном (3×50 мл), сушили в вакууме и растворяли в 75 мл этанола. К полученному раствору при интенсивном перемешивании добавляли 25 мл 2 н раствора хлористого водорода в этаноле, реакционную смесь перемешивали 1 ч, фильтровали и из полученного раствора растворитель удаляли при пониженном давлении. После переосаждения из этанола диэтиловым эфиром выход 7.22 г (68%). ИК и ЯМР спектры соединения аналогичны описанным выше.

в. К раствору 2.2 г (55 ммоль) гидроксида натрия в 20 мл воды добавляли 9.71 г (50 ммоль) октагидродипирроло[1,2-*a*:1',2'-*d*]пиазин-5,10-диона **6**. После перемешивания в течение 24 ч к реакционной смеси при интенсивном перемешивании по каплям добавляли 27.5 мл 2 н соляной кислоты и растворитель отгоняли при пониженном давлении. Продукт экстрагировали из остатка этанолом, раствор фильтровали и концентрировали до объема 20 мл. Выпавший после добавления 150 мл диэтилового эфира осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром и сушили в вакууме до постоянного веса. Выход 7.45 г (73%). ИК и ЯМР спектры совпадают с описанными выше.

Метил N-(трет-бутилоксикарбонил)-L-пролил-L-пролинат (2). а. К охлажденному до 0°C раствору 21.53 г (100 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонил-L-пролина в 100 мл тетрагидрофурана при перемешивании последовательно добавляли раствор 21.01 г (102 ммоль) DCC в 100 мл тетрагидрофурана, 17.06 г (103 ммоль) гидрохлорида метилового эфира L-пролина и по каплям раствор 10.43 г (103 ммоль) триэтиламина в 50 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч, выпавший осадок отфильтровывали, растворитель из полученного раствора отгоняли при пониженном давлении, остаток промывали охлажденным гексаном и продукт реакции экстрагировали эфиром. Полученный раствор фильтровали, и растворитель удаляли при пониженном давлении. Маслообразный продукт сушили в вакууме до постоянного веса. Выход 25.13 г (77 %), $[\alpha]_D^{20}$ –102.1° (с 2, MeOH). ИК спектр, ν , см⁻¹: 1747, 1699, 1662 (C=O). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м.д.: 1.0 с, 1.05 с (9H, 3CH₃), 1.40–1.53 м (2H, CH₂), 1.53–1.75 м (4H, 2CH₂), 1.75–1.87 м (2H, CH₂), 2.98–3.08 м, 3.10–3.20 м, 3.20–3.29 м, 3.36–3.43 м (4H, 2CH₂), 3.30 с, 3.32 с (3H, CH₃), 4.01–4.07 м, 4.08–4.17 м (2H, 2CH). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ , м.д.: 22.81, 22.33, 24.30, 24.34, 27.57, 27.73, 28.02, 28.13, 28.30, 29.20, 45.80, 45.87, 45.92, 46.15, 51.23, 51.31, 57.03, 57.06, 58.03, 78.48, 152.94, 153.68, 170.37, 170.87, 171.70, 171.94. Найдено, %: С 58.97; Н 8.21; N 8.32. С₁₆H₂₆N₂O₅. Вычислено, %: С 58.88; Н 8.03; N 8.58.

б. К охлажденному до –16°C раствору 21.53 г (100 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонил-L-пролина и 10.12 г (100 ммоль) триэтиламина в 350 мл хлористого метилена по каплям добавляли 13.66 г (100 ммоль) IBCF. После перемешивания в течение

15 мин при указанной выше температуре к реакционной смеси последовательно добавляли 17.39 г (105 ммоль) гидрохлорида метилового эфира L-пролина и по каплям 10.63 г (105 ммоль) триэтиламина. После перемешивания при температуре $-12 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 2 ч температуру реакционной смеси медленно доводили до комнатной и перемешивание продолжали в течение 5 ч. Реакционную смесь фильтровали, полученный раствор последовательно промывали 0.7 н раствором соляной кислоты (3×50 мл), водой (2×50 мл), насыщенным раствором бикарбоната натрия (3×50 мл), водой (3×50 мл) и сушили над безводным сульфатом натрия. Раствор фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток промывали охлажденным гексаном и сушили в вакууме до постоянного веса. Выход 22.85 г (70%). ИК и ЯМР спектры аналогичны описанным выше.

***N*-трет-Бутилоксикарбонил-L-пролил-L-пролин (3).** К раствору 21.22 г (65 ммоль) метил *N*-(трет-бутилоксикарбонил)-L-пролил-L-пролината **2** в 200 мл метанола добавляли раствор 2.8 г (70 ммоль) гидроксида натрия в 50 мл воды. После перемешивания в течение 20 ч к реакционной смеси добавляли 250 мл воды, метанол отгоняли при пониженном давлении, смесь фильтровали и полученный раствор подкисляли лимонной кислотой. Продукт реакции экстрагировали хлористым метилом, полученный раствор сушили сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали отгонкой растворителя при пониженном давлении до объема 50 мл. Выпавший после добавления 250 мл гексана осадок отделяли от маточного раствора, промывали гексаном и сушили в вакууме. Выход 15.43 г (76%), т.пл. $181\text{--}183^\circ\text{C}$ ($185\text{--}187^\circ\text{C}$ [7]), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -131^\circ$ (*c* 2, H_2O). ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1753, 1688, 1609 (C=O). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 1.26 с, 1.32 с (9H, 3CH_3), 1.68–1.78 м, 1.85–2.14 м (8H, 4CH_2), 3.25–3.38 м, 3.40–3.55 м, 3.62–3.70 м (4H, 2CH_2), 4.24–4.30 м, 4.38–4.43 м, 4.45–4.53 м (2H, 2CH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 23.49, 23.99, 24.77, 28.15, 28.19, 28.35, 28.97, 29.80, 46.57, 46.71, 46.84, 57.60, 57.69, 58.97, 59.07, 79.64, 79.69, 153.68, 154.59, 172.11, 172.50, 173.67, 174.08. Найдено, %: C 58.00; H 7.51; N 8.78. $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, %: C 57.68; H 7.74; N 8.97.

Гидрохлорид L-пролил-L-пролина (4). К раствору 12.48 г (40 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонил-L-пролил-L-пролина **3** в 50 мл диоксана

добавляли 40 мл 6.25 н раствора хлористого водорода в диоксане. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч и продукт реакции высаждали добавлением 250 мл диэтилового эфира. Осадок отделяли от растворителя, дважды промывали эфиром и сушили в вакууме до постоянного веса. Выход 8.95 г (90%), т.пл. $164\text{--}166^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -146^\circ$ (*c* 2, H_2O). ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1754, 1665 (C=O). Спектр ЯМР ^1H (CD_3OD), δ , м.д.: 1.95–2.14 м (6H, 3CH_2), 2.29–2.40 м (1H), 2.52–2.62 м (1H) (CH_2), 3.34–3.42 м (1H), 3.42–3.50 м (1H) (CH_2), 3.56–3.64 м (1H), 3.73–3.80 м (1H) (CH_2), 4.51 т (1H, *J* 6.9 Гц, CH), 4.66 т (1H, *J* 7.0 Гц, CH). Спектр ЯМР ^{13}C (CD_3OD), δ , м.д.: 25.06, 25.82, 29.45, 30.03, 47.67, 48.14, 60.30, 60.52, 168.33, 174.60. Найдено, %: C 48.04; H 7.12; Cl 14.51; N 11.08. $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_3$. Вычислено, %: C 48.29; H 6.89; Cl 14.25; N 11.26.

Метил *N*-трифторацетил-L-пролил-L-пролинат (5). К охлажденному до 0°C раствору 21.11 г (100 ммоль) *N*-трифторацетил-L-пролина в 100 мл тетрагидрофурана последовательно добавляли раствор 21.63 г (105 ммоль) DCC в 150 мл тетрагидрофурана, 17.39 г (105 ммоль) гидрохлорида метилового эфира L-пролина и по каплям раствор 10.63 г (105 ммоль) триэтиламина в 50 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч, фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт реакции экстрагировали из остатка диэтиловым эфиром, полученный раствор фильтровали и концентрировали отгонкой растворителя в вакууме до появления осадка. Выпавший после добавления 150 мл гексана осадок отфильтровывали, промывали гексаном и сушили в вакууме. После переосаждения из диэтилового эфира гексаном выход 23.85 г (74%), т.пл. $99\text{--}102^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -92.7^\circ$ (*c* 2, тетрагидрофуран). ИК спектр, ν , cm^{-1} : 1748, 1697, 1660 (C=O). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 1.87–2.05 м (5H), 2.12–2.23 м (3H) (4CH_2), 3.53–3.62 м (1H), 3.66–3.73 (1H), 3.73–3.84 м (2H) (2CH_2), 3.65 с (3H, CH_3), 4.49 к (1H, *J* 4.5 Гц, CH), 4.65 к (1H, *J* 4.0 Гц, CH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 24.89, 24.94, 27.71, 28.81, 46.74, 47.47, 52.19, 58.80, 59.26, 116.12 к (*J* 227 Гц), 155.62 к (*J* 30 Гц), 168.95, 172.53. Найдено, %: C 48.33; H 5.12; N 8.48. $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено, %: C 48.45; H 5.32; N 8.69.

Октагидродипирроло[1,2-*a*:1',2'-*d*]пиазин-5,10-дион (6). К раствору 16.56 г (100 ммоль) гидрохлорида метилового эфира L-пролина в

100 мл метанола добавляли 10.12 г (100 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали в течение часа, растворитель удаляли при пониженном давлении, продукт реакции экстрагировали из остатка диэтиловым эфиром, полученный раствор фильтровали, растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток растворяли при нагревании в 50 мл диоксана и полученный раствор кипятили при интенсивном перемешивании в течение 20 ч. Выпавший после охлаждения смеси осадок отфильтровывали, дважды промывали диэтиловым эфиром и сушили в вакууме. После переосаждения из хлороформа диэтиловым эфиром выход 13.21 г (68%), т.пл. 137–140°C, $[\alpha]_D^{20}$ –102.1° (*c* 0.5, H₂O). ИК спектр, ν , см⁻¹: 1656 (C=O). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м.д.: 1.78–1.85 м (2H, CH₂), 1.88–1.95 м (2H, CH₂), 2.02–2.10 м (2H, CH₂), 2.17–2.24 м (2H, CH₂), 3.38–3.45 м (4H, 2CH₂), 4.08 т (2H, *J* 8.0 Гц, 2CH). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ , м.д.: 23.24; 27.60; 45.08; 60.41; 166.28. Найдено, %: С 62.03; Н 7.39; N 14.19. С₁₀H₁₄N₂O₂. Вычислено, %: С 61.84; Н 7.27; N 14.42.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ellison A.J., Van Veller B., Raines R.T. *Biopolymers*. **2015**, *104*, 674. doi 10.1002/bip.22700
2. Nakamura T., Mizutani J., Ohki K., Yamada K., Yamamoto N., Takeshi M., Takazawa K. *Atherosclerosis*. **2011**, *219*, 298. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.007
3. Hirota T., Nonaka A., Matsushita A., Uchida N., Ohki K., Asakura M., Kitakaze M. *Heart Vessels*. **2011**, *26*, 549. doi 10.1007/s00380-010-0096-y
4. Li J., Sha Y. *Molecules*. **2008**, *13*, 1111. doi 10.3390/molecules13051111
5. Curphey T.J. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2805. doi 10.1021/jo01329a049
6. Позднев В.Ф. *ХПС*. **1974**, 764.
7. Tsunematsu H., Isobe R., Hanazono H., Soeda Y., Inagaki M., Ito N., Higuchi R., Yamamoto M. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1040. doi 10.1248/cpb.47.1040

Synthesis of Prolylproline

V. A. Haidukevich, L. A. Popova, Z. P. Zubreichuk, and V. A. Knizhnikov*

*Institute of Physical Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus,
220072, Belarus, Minsk, ul. Surganova 13
e-mail: knizh@ifoch.bas-net.by

Received January 31, 2018; revised March 6, 2019; accepted March 15, 2019

Prolylproline is obtained both by classical peptide synthesis using a *tert*-butoxycarbonyl or trifluoroacetyl amino protecting groups and a carbodiimide method for the formation of a peptide bond, and by opening of the diketopiperazine ring of the octahydrodipyrrolo[1,2-*a*:1',2'-*d*]pyrazine-5,10-dione obtained by thermolysis of proline methyl ether.

Keywords: prolylproline, octahydrodipyrrolo[1,2-*a*:1',2'-*d*]pyrazine-5,10-dione, *tert*-butoxycarbonyl and trifluoroacetyl amino protecting groups, carbodiimide method