

УДК 547.497.6

ХИМИЯ

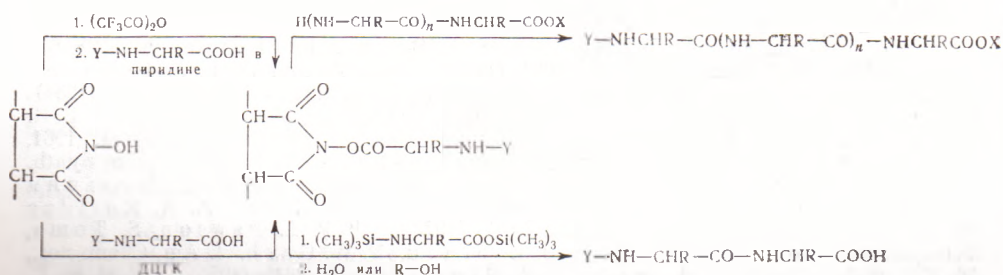
С. В. РОГОЖИН, Ю. А. ДАВИДОВИЧ, С. М. АНДРЕЕВ, А. И. ЮРТАНОВ

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРНОГО МАКРОСЕТЧАТОГО N-ОКСИСУКЦИНИМИДА

(Представлено академиком А. Н. Несмеяновым 2 IV 1973)

В сообщении (¹) мы описали простой и удобный способ синтеза равномерно шитого, макросетчатого сополимера N-оксималенимида со стиролом или этиленом в гранулированной форме, исходя из стандартных сополимеров малеинового ангидрида с упомянутыми винильными мономерами. Высокая проницаемость полученных гранулированных сополимеров, способность набухать в различных органических растворителях и высокое содержание реакционноспособных N-оксисукцинимидных групп создают предпосылки для их эффективного использования в качестве полимерных активаторов карбоксильной группы N-защищенных аминокислот и пептидов.

В настоящей работе описывается синтез ряда модельных ди-, три- и тетрапептидов (см. табл. 2) методом полимерных активированных эфиров с применением полученных нами макросетчатых гранулированных поли-N-оксисукцинимидов. Для этой цели были использованы две фракции полимерных продуктов с размером гранул 20–80 и 200–400 м. Несмотря на большое различие размеров гранул, при проведении различных стадий пептидного синтеза не наблюдалось заметной разницы в отношении выхода продуктов реакции, что является свидетельством изотропности структуры и высокой проницаемости используемых полимеров. Кроме того, упомянутые гранулы отличались высокой механической прочностью и осмотической устойчивостью. Они не разрушались в условиях длительного перемешивания и легко отделялись от реакционного раствора фильтрованием. Ацилирование полимерных N-оксисукцинимидов N-защищенными аминокислотами (см. схему 1) осуществляли двумя способами — дициклогексилкарбодиимидным (ДЦГК) (²) и трифторацетатным (ТФА) (³), причем второй метод оказался наиболее эффективным. Он экономичен и обеспечивает высокий выход полимерных активированных эфиров с минимальной затратой времени. Его применение устраняет проблемы, связанные с отделением от полимера труднорастворимой дициклогексилмочевины, которая образуется при использовании метода ДЦГК. Выход полимерного активированного эфира N-защищенной аминокислоты определяли по привесу полимерного продукта реакции и контролировали аминолизом полимера избытком циклогексиламина.



Y-N-защитная группа; X-C-защитная группа; R-боковой радикал аминокислоты

Полимерные N-оксисукцинимидные эфиры N-защищенных аминокислот

N-защищенная аминокислота	Метод конденсации	Содержание аминокислотных остатков в сополимере, ммол/г	N-защищенная аминокислота	Метод конденсации	Содержание аминокислотных остатков в сополимере, ммол/г
KB3 — Pro — OH	ДЦГК	1,75	БОК — Gln — OH	ТФА	1,50
KB3 — Pro — OH	ТФА	2,00	БОК — Trp — OH	ДЦГК	1,88
БОК — Pro — OH	ТФА	2,10	БОК — Ala — OH	ТФА	2,00
KB3 — Pro — Leu — OH	ТФА	1,20	KB3 — Val — OH	ТФА	1,95
БОК — Leu — OH	ДЦГК	1,70	БОК — Asp — OH	ТФА	1,70
KB3 — Cys(S — Bzl) — OH	ТФА	1,65	KB3 — Asp(OMe) — OH	ТФА	1,65
KB3 — Leu — OH	ТФА	1,90	БОК — Gly — OH	ДЦГК	1,90
БОК — Ile — OH	ТФА	1,85			

Примечание. Все аминокислоты L-конфигурации. Сополимер N-оксималеимида со стиролом, сшитый 4 мол.% бензидина. KB3 — N-бензилоксикарбонильная группа; БОК — N-трет-бутилоксикарбонильная группа.

Таблица 2

Пептиды, синтезированные с помощью полимерного макросетчатого N-оксисукцинимиды

Синтезированные пептиды	Аминокислотный компонент	Выход, %	Т. пл., °C	$[\alpha]_D^{22}$
БОК — Leu — Phe — OMe	H — Phe — OMe	99	88—90	—23,5° (C = 0,5; MeOH)
БОК — Leu — Gly — Phe — OMe	H — Gly — Phe — OMe	96	98—99	—6,9 (C = 0,5; MeOH)
БОК — Ala — Leu — Gly — Phe — OMe	H — Leu — Gly — Phe — OMe	95	155—156	—23,3 (C = 0,5; MeOH)
БОК — Leu — Gly — OMe	H — Gly — OMe	100	132	—27,5 (C = 1; MeOH)
БОК — Leu — Gly — OEt	H — Gly — OEt	98	78—79	
БОК — Pro — Leu — Gly — OMe	H — Leu — Gly — OMe	94	120—122	—59,0 (C = 2; ДМФА)
KB3 — Pro — Leu — Gly — OMe	H — Leu — Gly — OMe	87,5	122—123	—84,0 (C = 0,5; MeOH)
KB3 — Pro — Leu — Gly — OMe	H — Gly — OMe	97	122—123	—80,0 (C = 0,5; MeOH)
KB3 — Leu — Gly — OMe	H — Gly — OMe	100	91	—25,9 (C = 0,5; MeOH)
KB3 — Pro — Leu — OH	Me ₃ Si — Leu — OSiMe ₃	97	139—140	—65,5 (C = 1; MeOH)
KB3 — Leu — Gly — OH	Me ₃ Si — Gly — OSiMe ₃	100	117	—24,6 (C = 1; MeOH)
KB3 — Cys(S — Bzl) — Pro — OH	Me ₃ Si — Pro — OSiMe ₃	99	Масло	—77,6 (C = 0,8; CHCl ₃)
KB3 — Cys(S — Bzl) — Tyr — OH	Me ₃ Si — Tyr (SiMe ₃) — OSiMe ₃	97	193—194	—14,5 (C = 4,5; пиридин)
KB3 — Pro — Pro — OH	Me ₃ Si — Pro — OSiMe ₃	97	188—190	—102 (C = 1; MeOH)

В табл. 1 приведены результаты синтеза полимерных активированных эфиров N-защищенных аминокислот по описанной схеме. Синтез пептидов осуществляли обработкой полимерного реагента II (1,0–1,2 экв.) эфиром аминокислоты (1 экв.) или пептида (1 экв.) при комнатной температуре в течение 5–10 час. в среде тетрагидрофурана (ТГФ) или диметилформамида (ДМФА). В качестве аминокислотного компонента использовали также триметилсилильные производные аминокислот и пептидов (1 экв.). Как правило, после отделения полимерного продукта реакции фильтрованием и удалением растворителя из фильтрата мы получали в остатке хроматографически чистые пептиды с практически количественным выходом (табл. 2). Следует отметить, что применение триметилсилильных производных аминокислот и пептидов для аминокислотного анализа полимерных активированных эфиров не было известно в литературе. Эти производные не только легко доступны, но и обладают существенными преимуществами по сравнению с обычными эфирами аминокислот и пептидов, поскольку их использование в качестве аминокислотных компонентов приводит к получению легко гидролизующихся триме-

триметилсилиловых эфиров соответствующих пептидов. Кроме того, триметилсилильные производные аминокислот и пептидов обладают исключительно высокой растворимостью в различных органических растворителях, что, как известно, имеет огромное значение для синтеза пептидов.

Высокая реакционная способность, значительная реакционная емкость и гранулярная форма используемых полимерных реагентов обеспечивают возможность проведения пептидного синтеза по описанной схеме колоночным методом, что создает предпосылки для автоматизации процесса синтеза. В настоящей работе описан в качестве примера синтез колоночным методом модельного дипептида КВЗ — Leu — Gly — OMe.

В заключение необходимо отметить, что сополимер, отделяемый от раствора после проведения реакции аминолиза полимерного активированного эфира, легко регенерируется до исходного поли-N-оксисукцинимидом обработкой каким-либо простым амином, например избытком циклогексиламина, и последующей промывкой растворителем.

Триметилсилильные производные аминокислот были получены обработкой соответствующих аминокислот небольшим избытком триметилсилдидиэтиламина при нагревании (*). Гомогенность пептидных производных устанавливали тонкослойной хроматографией на силикагеле (на пластинках «Силуфол») с использованием трех систем: *n*-бутанол — вода — $\text{CH}_3\text{COOH} = 4 : 1 : 1$, этанол — вода = 7 : 3 и хлороформ — метанол — $\text{CH}_3\text{COOH} = 5 : 3 : 3$.

1. Полимерные N-оксисукцинимидные эфиры N-защищенных аминокислот. а) Метод ДЦГК. К суспензии гранулярного сополимера N-оксималеимида со стиролом, сшитого 4 мол. % бензида (1 экв. N — OH-групп), в растворе БОК — Trp (2 экв.) в смеси ДМФА (15%) и метилхлорида (85%), охлажденной до 0°, прибавляли раствор ДЦГК (3 экв.) в той же смеси растворителей и перемешивали при 0° 15 час. Затем полимер отфильтровывали, промывали метанолом и эфиром и сушили в вакууме. Рассчитанное содержание БОК — Trp в полученном полимерном реагенте 1,88 ммол/г. И.-к. спектр: 1820, 1740 см^{-1} .

б) Метод ТФА. К 5,00 г упомянутого в п. а) сополимера прибавляли 12 мл трифторуксусного ангидрида и выдерживали 30 мин. (при этом наблюдается саморазогрев набухшего полимера). Затем полимер отфильтровывали, промывали сухим эфиром и суспендировали в растворе 3,85 г (0,5 экв.) КВЗ — Pro — Leu — OH в 37 мл сухого пиридина. Суспензию перемешивали 1 час, полимер отфильтровывали, промывали метанолом, увлажненным ацетоном, эфиром и сушили в вакууме. Выход полимерного активированного эфира 8,42 г (94% в расчете на исходный дипептид). Содержание дипептида в полимерном реагенте 1,15 ммол/г. И.-к. спектр 1820 см^{-1} . Аналогичные методики были использованы для получения других полимерных активированных эфиров, указанных в табл. 1.

2. Синтез пептидов (типичные методики): а) БОК — Leu — Phe — OMe. К суспензии 1,5 г полимерного N-оксисукцинимидного эфира БОК — L — лейцина (2,64 ммол.) и 0,284 г (1,32 ммол.) хлоргидрата метилового эфира L-фенилаланина в 30 мл ДМФА прибавляли 0,185 мл (1,32 ммол.) триэтиламина и смесь перемешивали 10 час. при комнатной температуре. Полимер отфильтровывали, промывали ДМФА и фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в смеси этилацетата и воды, органический слой промывали водой и сушили над сульфатом натрия. После удаления этилацетата получали 0,50 г кристаллического продукта с т. пл. 88—90°. Выход 98%. $[\alpha]_D^{22} -23,5^\circ$ ($C = 0,5$; метанол). Элементный анализ подтверждает формулу $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$.

б) BKЗ — Leu — Gly — OH. К суспензии полимерного N-оксисукцинимидного эфира КВЗ — L — лейцина (19,5 ммол.) в 70 мл сухого ТГФ прибавляли бис-триметилсилилглицин (19,5 ммол.) и реакционную смесь перемешивали 16 час. при комнатной температуре. Полимер отфильтровывали, промывали ТГФ, эфиром, метанолом и фильтрат упаривали в вакууме до-

суха. Остаток растворяли в этилацетате, промывали раствор водой и сушили над безводным сульфатом натрия. После удаления этилацетата в вакууме было получено кристаллическое вещество с т. пл. 117°. Выход КБЗ — Leu — Gly — OH 100%. $[\alpha]_D^{21} - 24,6^\circ$ ($C = 1$; метанол). Элементный анализ подтверждает формулу $C_{16}H_{24}N_2O_5$.

в) БКЗ — Leu — Gly — Ome (колоночный метод). В верхнюю часть колонки (1 × 40 см), заполненной полимерным N-оксисукцинимидным эфиром КБЗ — L — лейцина (1,8 ммол/г), (гранулы 80–120 мк) в ТГФ, вводили раствор метилового эфира глицина в ТГФ (при соотношении карбоксильного и аминокомпонента 2:1) и элюировали ТГФ со скоростью 12 мл в час при 20°. Элюат детектировали с помощью проточного у.-ф. спектрофотометра типа «Увикорд» при 250 мк. Из фракции 30–60 мл, соответствующей единственному пику на спектрофотограмме, выделили после удаления растворителя хроматографически чистый дипептид с практически количественным выходом.

Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР
Москва

Поступило
11 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. В. Рогожин, Ю. А. Давидович и др., ДАН, 211, № 6 (1973). ² G. W. Anderson, I. E. Zimmerman, M. Callahan, J. Am. Chem. Soc., 86, 1839 (1964). ³ S. Sakakibara, N. Inukai, Bull. Chem. Soc. Japan, 38, № 11, 1979 (1965). ⁴ P. S. Mason, E. D. Smith, J. Gas. Chromatogr., 4, 398 (1966).