



УДК 547.824 + 547.461.3 052.2:547.964.4

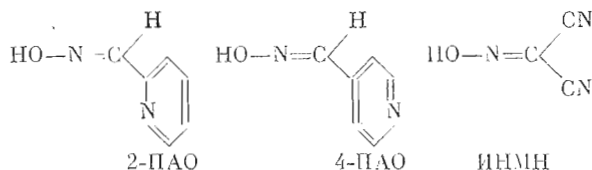
**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ 2-ПИРИДИНАЛЬДОКСИМА,
4-ПИРИДИНАЛЬДОКСИМА И ИЗОНИТРОЗОМАЛОНИТРИЛА
НА СТЕПЕНЬ РАЦЕМИЗАЦИИ ПРИ СИНТЕЗЕ ПЕПТИДОВ
ДИЦИКЛОГЕКСИЛКАРБОДИИМИДНЫМ МЕТОДОМ*****Романовский П. Я., Крикис А. Ю., Юхневич А. Д.,
Чипенс Г. И.***Институт органического синтеза Академии наук ЛатвииССР, Рига*

С помощью теста Изумии — Мураока исследовано влияние 2-ПАО, 4-ПАО и ИНМН на рацемизацию С-концевой аминокислоты при активации карбоксильной группы ацилпептида дициклогексилкарбодимидом. Показано, что ИНМН является высокоэффективной добавкой для снижения степени рацемизации.

Одним из конденсирующих агентов, широко применяемых в синтезе пептидов для сочетания их фрагментов, является дициклогексилкарбодимид [1]. Однако активация карбоксильной группы ацилпептида дициклогексилкарбодимидом часто сопровождается значительным понижением оптической чистоты пептида вследствие рацемизации С-концевого аминокислотного остатка (см. обзоры [2, 3, 4]). Согласно работе [5] для уменьшения степени рацемизации к реакционной среде рекомендуется добавлять сильнонулеофильный агент, функции которого заключаются в предотвращении образования азлактона или в его расщеплении без потери оптической активности. Промежуточное соединение, которое при этом образуется, должно быстро расщепляться в условиях аминолиза.

Как наиболее эффективные добавки для снижения степени рацемизации в настоящее время применяются N-оксисукцинимид [6], 4-оксипензотриазол [7] и 3-окси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазин [5]. Степень рацемизации снижают также хлорзамещенные 8-оксихинолины [8], *n*-хлор- или *n*-нитробензосульфидроксиамовые кислоты [9], а также амид и этиловый эфир 2-оксимино-2-циануксусной кислоты [10].

Ранее нами была показана возможность использования для синтеза пептидов O-ациламиноацилпроизводных 2-ПАО и 4-ПАО [11]. В настоящем сообщении приводятся результаты исследования этих оксимов, а также ИНМН [12] в качестве добавок, снижающих степень рацемизации при синтезе пептидов карбодимидным методом.

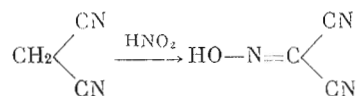


* Принятые сокращения: 2-ПАО и 4-ПАО — соответственно 2- и 4-пиридинальдоксим, ИНМН — изонитрозомалонитрил.

**Сопоставление степеней рацемизации С-концевой аминокислоты ацилпептида
в различных вариантах образования пептидной связи**

Номер	Реагент сочетания	Добавочная компонента	Эквиваленты	Степень рацемизации, %	
				данные нашей работы	данные работ
1	Дициклогексилкарбодимид	—	—	24,4	22 [14]
2		2-ПАО	2	27,2	
3		4-ПАО	2	25,2	
4		ИНМН	1	2,7	
5		ИНМН	2	2,2	
6		1-Оксибензотриазол	2	4,7	
7	1-Этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин	—	—	4,3	0,2 [14]
8	Пентахлорфениловый эфир трихлоруксусной кислоты	—	—	31,8	

Необходимый для проведения экспериментов ИНМН получали по модифицированной методике [12] действием нитрита натрия на малононитрил в растворе 50%-ной уксусной кислоты. Продукт



из реакционной среды выделяли в виде труднорастворимой серебряной соли, которую затем разлагали 4н. HNO_3 .

Для определения степени рацемизации при образовании пептидной связи мы применяли методику Изумии и Мураока [13, 14], основанную на сочетании бензилоксикарбонилглицил-*L*-аланина с широбензиловым эфиром *L*-лейцина с последующим отщеплением защитных групп и количественной оценкой соотношения образовавшихся диастереомерных форм (*L-L* и *D-L*) трипептида. Этот тест является простым и точным и в настоящее время широко применяется при исследовании различных методов синтеза пептидов [15, 16, 17]. Для более точной оценки полученных данных стандартный трипептид глицил-аланил-лейцин синтезирован нами также с использованием других методов конденсации: дициклогексилкарбодимидного [1], дициклогексилкарбодимидного с добавкой 1-оксибензотриазола [7], методов с применением 1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина [18] или пентахлорфенилового эфира трихлоруксусной кислоты [19]. Результаты определения степени рацемизации представлены в таблице.

Полученные нами результаты с учетом различий в методиках проведения экспериментов сопоставимы с данными других авторов [7, 10, 14, 16, 17, 19] (см., например, таблицу). Некоторые различия мы наблюдали лишь в случае активации ацилпептида 1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолином. Известно, что степень рацемизации при использовании этого реагента для конденсации фрагментов пептидов в значительной степени зависит от условий, например на твердофазном носителе в растворе диметилформамида, согласно данным теста Изумии — Мураока, достигает даже 8,5%, а в растворе диоксана она снижается до 1,2% [17]. Поэтому полученные в экспериментах 1 и 6—8 (см. таблицу) значения степени рацемизации мы использовали в качестве стандартов для оценки эффективности проверяемых добавок.

Из данных таблицы видно, что добавка 4-ПАО не снижает степень рацемизации, а присутствие в реакционной смеси 2-ПАО, наоборот, в некоторой степени способствует образованию рацемата. Эти результаты,

в принципе, сопоставимы с данными Лоссе и соавт. [20], которые с помощью теста Андерсона—Янга определили суммарную степень рацемизации в процессах образования и аминолиза активированного эфира ацилпептида с 3-нитроацетофеноноксидом. При использовании в качестве конденсирующего агента дициклогексилкарбодиимида после аминолиза была обнаружена рацемизация на 21%.

Из проверенных соединений по эффективности снижения степени рацемизации при образовании пептидной связи с помощью дициклогексилкарбодиимида заметно выделяется ИНМН (см. таблицу).

Следует отметить, что в ряду исследованных соединений значения pK_a меняются от 10,14 для 2-ПАО [21, 22] и 9,99 для 4-ПАО [21] до 2,93 для ИНМН. Таким образом, полученные нами данные говорят в пользу предположения [5], что способность оксидов понижать степень рацемизации при образовании пептидной связи дициклогексилкарбодиимидным методом в определенных пределах зависит от кислотности гидроксильной группы оксима: чем выше кислотность, тем выше нуклеофильность и, следовательно, способность соединения понижать степень рацемизации.

Экспериментальная часть

Упаривание растворителей проводили на роторном испарителе при остаточном давлении 14 мм рт. ст. Спектры ЯМР снимали на приборе фирмы «Perkin-Elmer» (США) (рабочая частота 60 МГц) в растворе CCl_4 с внутренним стандартом — тетраметилсиланом. ИК-спектры образцов снимали на приборе UR-10 фирмы «Karl — Zeiss» (ГДР) в виде суспензий в вазелиновом масле и гексахлорбутадиене. УФ-спектры получали на приборе «Specord-UV-vis» (ГДР). Константу ионизации (K_a) ИНМН при 20° определяли спектрофотометрически по методике, описанной в работе [23] (концентрация соединения 10^{-4} М в водном растворе).

Изонитрозомаionoнитрил. 6,6 г (100 ммоль) малононитрила растворяли в 40 мл 50%-ной уксусной кислоты и при температуре -10° в течение 1 ч по каплям прибавляли раствор 13,2 г (191 ммоль) нитрита натрия в 25 мл воды. Смесь оставляли на ночь при комнатной температуре, разбавляли водой до объема 500 мл и прибавляли насыщенный раствор 18,7 г (110 ммоль) нитрата серебра в воде. Выпавший желтый осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме над P_2O_5 . Выход серебряной соли ИНМН — 20,0 г (99,5%). Полученную серебряную соль ИНМН обрабатывали 4 н. HNO_3 до полного растворения. Раствор экстрагировали эфиром. Эфирный слой сушили над Na_2SO_4 , и эфир отгоняли при температуре не выше 20°. Выход 7,3 г (76%). ИНМН представляет собой светло-желтое подвижное масло, хорошо растворимое в эфире и воде; при нагревании разлагается, малоустойчиво при длительном хранении. d_{20} 1,03 г/см³ (пикнометрически). n_D^{20} 1,436. ИК (ν , см⁻¹): 3400—2800 (ассоциированный ОН); 2240 (—C≡N); 1600 ($\begin{matrix} \diagup \\ \diagdown \end{matrix}$ C=N—). ЯМР, δ м.д.: 9,03 (синглет, ОН). УФ (в воде): λ_{max} 286 нм, ϵ $8,4 \cdot 10^3$ (рН 7,55; c 10^{-4} М); λ_{max} 243 нм, ϵ $6,6 \cdot 10^3$ (рН 0,27; c 10^{-4} М). Изобестическая точка при 261 нм; pK_a 2,93.

Глицил-L-аланил-L-лейцин и определение степени рацемизации (см. таблицу, опыты 1—6). В 5 мл тетрагидрофурана суспензировали 0,44 г (1 ммоль) *n*-толуолсульфоната *n*-нитробензилового эфира *L*-лейцина, добавляли 0,1 г (1 ммоль) триэтиламина и перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре. К полученной суспензии добавляли 0,36 (1 ммоль) бензилоксикарбонилглицил-*L*-аланина и после охлаждения реакционной смеси до -10° добавляли раствор 0,21 г (1 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 5 мл тетрагидрофурана и в опытах 2—6 соответствующее количество добавочной компоненты (см. таблицу). Реакционную смесь перемешивали 30 мин при -10° и оставляли на 19 ч при комнатной

температуре. Отфильтровывали выпавший осадок (дициклогексилмочевину), и фильтрат упаривали досуха. Остаток промывали петролейным эфиром и сушили в вакуумном эксикаторе над P_2O_5 /KOH. Полученное вещество (0,16 г \sim 0,3 ммоль) растворяли в 10 мл 90%-ной уксусной кислоты и гидрировали над палладиевой чернью в течение 100 мин. Палладиевый катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха. Сухой остаток трипептида растворяли в 10 мл цитратного буфера (рН 2,2) и разделяли на ампинокислотном анализаторе ВС-200 фирмы «Bioscal» на колонке с ионообменной смолой аминокс-А6.

В условиях стандартной программы полного аминокислотного анализа *L-L*-трипептид выходил на 139-й мин (цитратный буфер, рН 6,42), а *D-L*-трипептид на 143-й мин. При количественной оценке соотношения диастереомеров были приняты одинаковые коэффициенты экстинкции продуктов взаимодействия *L-L*- и *D-L*-трипептидов с нилгидрином. Степень рацемизации (α) рассчитывали по формуле [13]:

$$\alpha = \frac{D-L\text{-пептид} \cdot 100}{L-L\text{-пептид} + D-L\text{-пептид}}, \%$$

В 10 мл тетрагидрофурана суспендировали 0,44 г (1 ммоль) *n*-толуолсульфоната *n*-нитробензилового эфира *L*-лейцина, добавляли 0,1 г (1 ммоль) триэтиламина и перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре. К полученной суспензии добавляли 0,36 г (1 ммоль) бензилоксикарбонилглицил-*L*-аланина и 0,25 г (1 ммоль) 1-этоксикарбонил-2-этоксипиперидина и перемешивали в течение 19,5 ч при комнатной температуре. Обрабатывали и определяли степень рацемизации как описано для опытов 1—6.

В 5 мл тетрагидрофурана растворяли 0,36 г (1 ммоль) бензилоксикарбонилглицил-*L*-аланина и добавляли 0,1 г (1 ммоль) триэтиламина и 0,41 г (1 ммоль) пентахлорфенилового эфира трихлоруксусной кислоты при 0° и перемешивали 20 мин при комнатной температуре. К смеси добавляли суспензию, полученную из 0,44 г (1 ммоль) *n*-толуолсульфоната *n*-нитробензилового эфира *L*-лейцина и 0,1 г (1 ммоль) триэтиламина в 5 мл тетрагидрофурана после перемешивания ее в течение 20 мин при комнатной температуре. Перемешивание смеси продолжали в течение 19,5 ч при комнатной температуре. Обрабатывали и определяли степень рацемизации как в опытах 1—6.

Авторы искренне благодарны сотрудникам Института органического синтеза АН ЛатвССР А. А. Авоту и В. С. Айзбаату за предоставление 2- и 4-пиридинальдоксимов и Ю. А. Бендеру за спектрофотометрическое исследование изонитрозомалонитрила.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sheehan J. C., Hess G. P. (1955) J. Amer. Chem. Soc., **77**, 1067—1068.
2. Шредер Э., Любке К. (1967) Пептиды, стр. 405, «Мир», М.
3. Kapoor A. (1970) J. Pharm. Sci., **59**, 1—27.
4. Garg H. G. (1970) J. Sci. and Ind. Res., **29**, 236—243.
5. König W., Geiger R. (1970) Chem. Ber., **103**, 2024—2033.
6. Weigand F., Hoffmann D., Prox A. (1968) Z. Naturforsch., **23 B**, 279, 280.
7. König W., Geiger R. (1970) Chem. Ber., **103**, 788—798.
8. Yajima H., Kurobe M., Koyama K. (1973) Chem. Pharm. Bull., **21**, 1612.
9. Yajima H., Kitagawa K., Kurobe M. (1973) Chem. and Pharm. Bull., **21**, 2566—2567.
10. Itoh M. (1973) Bull. Chem. Soc. Japan, **46**, 2219—2221.
11. Romanovski P. J., Muizhnieks V. E., Chipens G. I. (1973) in Peptides 1972 (H. Hansson, H.-D. Jakubke, eds), pp. 97—102, North—Holland Publishing Co. American Elsevier, Amsterdam.
12. Longo G. (1931) Gass. Chim. Itall., **61**, 575—583.
13. Izumiya N., Muraoka M. (1969) J. Amer. Chem. Soc., **91**, 2391, 2392.
14. Izumiya N., Muraoka M., Aoyagi H. (1971) Bull. Chem. Soc. Japan, **44**, 3391—3395.
15. Kisfaludy L., Nyeki O. (1972) Acta chim. Acad. scient. hung., **72**, 75, 76.
16. Митян Ю. В., Максимов Е. Е. (1973) Ж. общ. химии, **43**, 203—207.

17. Barton M. A., Lemieux R. U., Savoie J. Y. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 4501—4506.
18. Belleau B., Malek G. (1968) J. Amer. Chem. Soc., 90, 1651, 1652.
19. Fujino M., Hatanaka Ch. (1968) Chem. Pharm. Bull., 16, 929—932.
20. Losse G., Hoffmann K.-H., Hetzer G. (1965) Liebigs Ann. Chem., 684, 236—242.
21. Cecchi P. (1958) Ricerca sci., 28, 2526—2531.
22. Green R. W., Freer I. R. (1961) J. Phys. Chem., 65, 2211—2213.
23. Альберт А., Сержент Е. (1964) Константы ионизации кислот и оснований, стр. 64, «Химия», М., Л.

Поступила в редакцию
10.11.1975

**THE EFFECT OF 2-PYRIDINEALDOXIME, 4-PYRIDINEALDOXIME AND
ISONITROSOMALONONITRILE ON RACEMIZATION
IN DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE PEPTIDE SYNTHESIS**

ROMANOVSKY P. Ia., KRIKIS A. Yu., YUCHNEVITCH A. D.,
CHIPENS G. I.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences
of the Lat.SSR Riga*

The Izumiya-Muraoka test has been used to study the effect of 2- and 4-pyridineal-
doximes and isonitrosomalnonitrile on racemization of C-terminal amino acid of acil-
peptide in the course of dicyclohexylcarbodiimide activation. The latter compound
was found to decrease effectively the extent of racemization.
