



УДК 547.964.4'.11\*3.057

## РЕГИОСЕЛЕКТИВНОЕ ДЕЙТЕРИРОВАНИЕ ДИПЕПТИДОВ

Тихонов В. Е., Ямсков И. А., Бахмутов В. И.,  
Цыряпкин В. А., Даванков В. А.

Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова  
Академии наук СССР, Москва

Установлено, что дейтерирование дипептидов, таких, как Gly-Ala, Gly-Val, Gly-Trp, Gly-Leu, Ala-Ala, Ala-His, Asp-Phe, DL-Ala-DL-Ser, DL-Ala-DL-Met в  $^2\text{H}_2\text{O}$  в присутствии полимерного катализатора, включающего фрагменты салицилсвого альдегида, при 60–70° С в области р<sup>2</sup>H 12,4–12,9 и в присутствии соли алюминия протекает региоселективно по N-концевой аминокислоте дипептида и исключительно в ее  $\alpha$ -положение. Абсолютная конфигурация C-концевой аминокислоты при этом сохраняется.

Синтез меченых дейтерием или тритием по N- и/или C-концевому аминокислотному остатку дипептидов, используемых в химических и биохимических исследованиях, включает в себя обычно каталитическое взаимное действие неопредельных предшественников дипептидов с газообразным дейтерием или тритием в присутствии катализаторов  $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$ -обмена (например, Pd/BaSO<sub>4</sub>) или родийфосфинового катализатора [1, 2]. Кроме того, меченые дипептиды получают обычными методами пептидной химии, используя меченные дейтерием или тритием защищенные аминокислоты [3].

Наиболее простым методом получения меченых дейтерием дипептидов представляется каталитическое замещение одного или нескольких атомов водорода в N- или C-концевом фрагменте дипептида по механизму  $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$ -обмена. С этой целью нами было изучено направленное дейтерирование дипептидов в условиях, приводящих к рацемизации оптически активных аминокислот [4]. Рацемизацию аминокислот со свободной аминогруппой проводят нагреванием их водных растворов при рН 7–12 и температуре 20–120° С в присутствии в качестве катализаторов пиридоксаля, салицилового альдегида или их производных, в том числе и полимерных, и солей  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Al}^{3+}$  [5–8]. При замене  $^1\text{H}_2\text{O}$  на  $^2\text{H}_2\text{O}$  получают меченные дейтерием аминокислоты [9].

Известно, что рацемизация аминокислотных остатков в дипептидах при рН 7–8 протекает медленно даже при высокой температуре (~120° С); при этом рацемизируются как N-, так и C-концевые остатки [10–12] (табл. 1). Прямая региональная направленность рацемизации дипептидов, как оказалось, связана как со структурой аминокислотных остатков, так и с их взаимным расположением в дипептиде, причем структура аминокислоты оказывает значительно большее влияние на скорость рацемизации остатка в C-положении, чем остатка в N-положении [11] (см. табл. 1). Высказано предположение, что стерические факторы проявляются при гидратации карбаниона дипептида, образующегося при отрыве одного из  $\alpha$ -H-атомов под действием основания [11].

С другой стороны, в свободных дипептидах [12] и в положительно заряженных комплексах дипептидов, таких, как  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_3(\text{Gly-Gly})]^+$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_3(\text{Ala-Gly})]^+$  и  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_3(\text{Gly-Ala})]^+$ , в растворе  $^2\text{H}_2\text{O}$  при р<sup>2</sup>H 11 и температуре 33° С наблюдали обмен  $\alpha$ -протонов C-концевой аминокислоты [13]. Аналогичный процесс, хотя и значительно более замедленный, наблюдали в отрицательно заряженном комплексе  $[\text{Co}(\text{Gly-Gly})_2]^-$  при р<sup>2</sup>H > 11 [14].

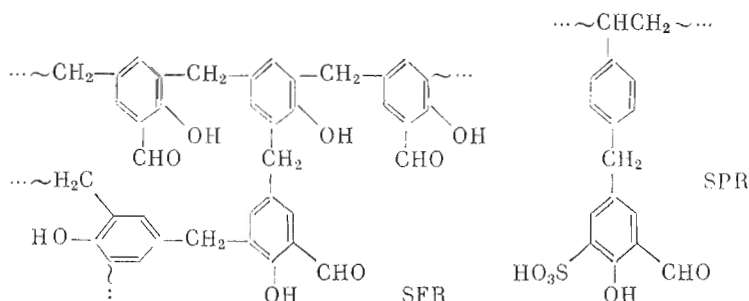
Рацемизация аминокислот в дипептидах по данным работы [11]  
 рН 7,6; 122,5° С, 8 ч, концентрация дипептида 0,02 М, ионная сила 0,1

Дипептид	Рассматриваемый остаток	Рацемизация (%) при положении остатка		С/Н *
		Н-концевом	С-концевом	
Ala-Gly, Gly-Ala	Ala	27,5	34,5	1,3
Leu-Gly, Gly-Leu	Leu	20,3	25,6	1,3
Val-Gly, Gly-Val	Val	13,0	3,6	0,27
Ala-Val, Val-Ala	Ala	20,2	32,5	1,6
	Val	26,0	5,6	0,21

\* Отношение степени рацемизации аминокислотного остатка при его С- и N-концевом положении.

Таким образом, из вышеприведенных данных ясно, что селективное дейтерирование свободных дипептидов, не связанных в виде инертных комплексов, представляет значительную проблему.

С целью получения селективно меченных по N-концу дипептидов нами был использован эффект повышения лабильности C<sup>α</sup>-H-протонов N-концевого остатка при образовании азотинной связи в основании Шиффа между NH<sub>2</sub>-группой дипептида и СНО-группой катализатора в присутствии солей Al<sup>3+</sup>. В качестве катализаторов были использованы нерастворимый гель, представляющий собой спитый фенолом салицилальдегидный полимер (SFR), и иммобилизованный на полистирольном каркасе салициловый альдегид, связанный с матрицей метиленовыми группами (SPR):



Дейтерирование проводили при 60–95° С в растворе <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (р<sup>2</sup>Н 12,4–12,9) в присутствии полимерного катализатора и AlF<sub>3</sub> в качестве сокатализатора в атмосфере азота. Так как при высоких значениях р<sup>2</sup>Н возможно гидролитическое разложение, реакцию смесь после завершения процесса дейтерирования анализировали, определяя содержание исходных дипептидов и продуктов их разложения (если такие образуются). Полученные результаты представлены в табл. 2.

Регионаправленность дейтерирования определяли методом ПМР-спектроскопии по изменению интегральной интенсивности поглощения соответствующих протонов. Анализ <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров дейтерированного на 90% по <sup>2</sup>H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-группе глицилаланина (рис. 1) и на 50% по <sup>2</sup>H<sub>2</sub>N-CH(Me)-CON<sup>2</sup>H-группе аланилаланина (рис. 2) показал, что в указанных условиях дейтерирование всех изученных дипептидов протекает региоселективно по N-концевому аминокислотному фрагменту и исключительно в его α-положение. При этом сигнал поглощения C<sup>α</sup>H-протонов N-концевого остатка всегда наблюдали в более сильном поле, чем сигнал соответствующих протонов С-концевого остатка дипептида (см. рис. 1 и 2); <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры остальных изученных дипептидов аналогичны представленным на рис. 1 и 2.

При дейтерировании одновременно протекает и рацемизация N-конце-

## Условия дейтерирования дипептидов

№	Пептид	Навеска пептида, г	Навеска катализатора SER, г	Навеска АПФ, г	pH	Объем H <sub>2</sub> O, мл	Температура, °C	Время реакции, ч	Степень замещения в N-концевом остатке, %	Состав смеси после реакции, мол. %
1	Ala-Ala	0,8	0,5	0,1	12,4	15,0	70	5	50	Ala-Ala D-Ala-Ala Ala Ala-Ala D-Ala-Ala Ala Ala-Ala Ala-Ala Gly-Ala Gly Ala Gly-Val Gly Val
2	Ala-Ala	0,2	0,2	0,02	12,4	5,0	95	11	90	
3	Ala-Ala	0,5	—	—	12,8	10,0	65	13	Нет	
4	Ala-Ala	0,2	—	0,02	12,4	10,0	65	13	»	
5	Gly-Ala	0,5	0,5	0,1	12,6	10,0	70	8	90	
6	Gly-Val	0,6	1,0	0,1	12,4	10,0	65	6	75	
7	Gly-Leu	0,5	1,0	0,1	12,6	15,0	65	19	88	
8	Gly-Leu	0,4	—	0,1	12,6	10,0	65	19	Нет	
9	Gly-Trp	0,12	0,3	0,05	12,7	10,0	60	15	97	
10	Ala-His	0,5	0,5	0,1	12,6	12,0	95	11	77	Не определяли
11	DL-Ala-DL-Ser	0,5	0,7	0,1	12,9	15,0	65	16	80	» Ala-Ser* Ala Ser
12	DL-Ala-DL-Ser	0,5	1,0	—	12,4	15,0	65	18	50	Ala-Ser* Ala Ser
13	DL-Ala-DL-Met	0,44	1,0	0,1	12,8	15,0	70	15	79	Ala-Met*
14	DL-Ala-DL-Met	0,4	—	—	12,9	10,0	65	13	Нет	Ala-Met*
15	Asp-Phe	0,5	0,5	0,1	12,9	12,0	95	17	9	Asp-Phe* Asp Phe Val-Val
16	Val-Val	0,5	0,5	0,1	12,9	10,0	85	14	Нет	
17	Gly-Ala	0,1	—	0,02	8,0	25,0	122	18	90	
18	Gly-Ala	0,1	0,025**	0,02	8,0	25,0	122	3	77** 90	
19	Gly-Ala	0,3	1,0**	0,05	8,4	10,0	90	17	25** 78 19**	

\* Суммарное содержание диастереомерных дипептидов.

\*\* Степень замещения по C-фрагменту.

\*\* Реакцию проводили в присутствии самциклового альдегида.

\*\* Реакцию проводили в присутствии полимера SPR (катализатор SER из-за резкого снижения набухаемости при pH &lt; 10 теряет активность).

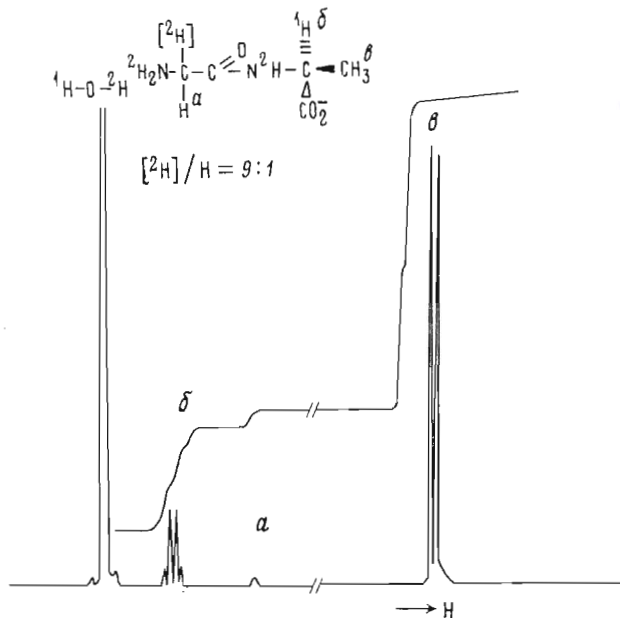


Рис. 1.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр дейтерированного глицилаланина в  $^2\text{H}_2\text{O}$

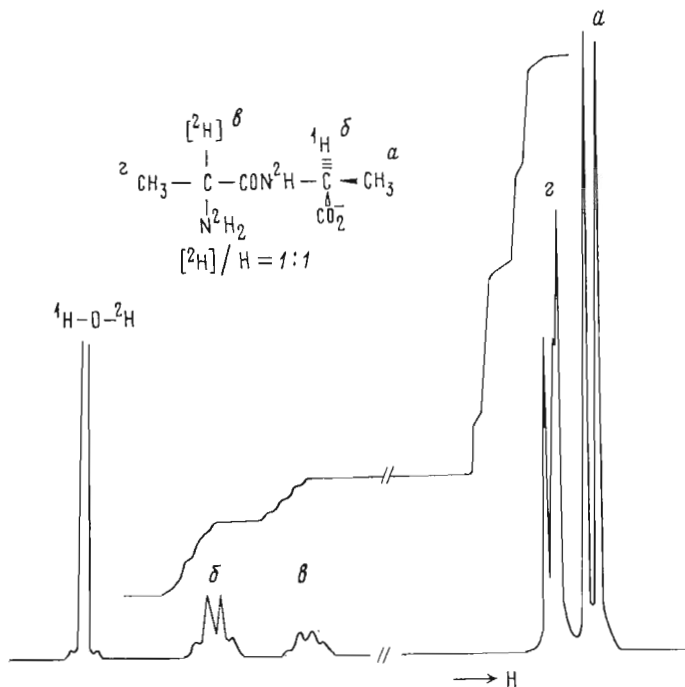
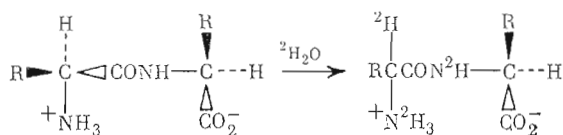


Рис. 2.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр дейтерированного аланилаланина в  $^2\text{H}_2\text{O}$

вой аминокислоты дипептида с сохранением абсолютной конфигурации С-концевой аминокислоты. Суммарный результат реакции можно представить в следующем виде:



Дипептиды Gly-Ala, Gly-Val, Gly-Leu, Gly-Trp, Ala-Ala, Ala-His и Ala-Met в области  $p^2H$  12,4–12,9 при 60–70° С в присутствии полимерного катализатора SFR и соли алюминия подвергаются в  $^2H_2O$  интенсивному дейтерированию при незначительном протекании гидролитического разложения (1–3 мол.%) (табл. 2). Исключение составляет лишь Ala-Ser, деструкция которого достигает 29%. Дипептид Asp-Phe подвергается дейтерированию в незначительной степени, а Val-Val вообще не удалось продейтерировать в указанных условиях. Повышение температуры вызывало значительную деструкцию дипептидов. В отсутствие полимерного катализатора дейтерирование в указанной области  $p^2H$  практически не наблюдается.

Итак, дейтерирование ряда дипептидов при высоких значениях  $p^2H$  раствора протекает региоселективно. При понижении  $p^2H$  до 8,0–8,4 и повышении температуры до 90–122° С наблюдается, как показано на примере Gly-Ala (см. табл. 2, № 16–18),  $^1H \rightarrow ^2H$ -обмен как в N-, так и в C-концевом фрагменте дипептида. При этом воздействие катализатора — как полимерного, так и самого салицилового альдегида — сводится к увеличению степени дейтерирования N-концевого фрагмента по сравнению со степенью дейтерирования C-концевого фрагмента дипептида. Наблюдаемая при  $p^2H \geq 12,4$  региоселективность  $^1H \rightarrow ^2H$ -обмена в дипептидах в присутствии катализаторов рацемизации связана, по-видимому, с двумя причинами: со значительным электростатическим ограничением  $^1H \rightarrow ^2H$ -обмена (протекающего через стадию промежуточного образования  $\alpha$ -карбаниона) в C-концевом фрагменте дипептида, имеющего депротонированные амидную и карбоксильную группы при  $p^2H > 12$  [15], и с увеличением лабильности C $\alpha$ -протона в N-концевом фрагменте дипептида за счет образования основания Шиффа и комплекса последнего с ионами алюминия.

### Экспериментальная часть

В работе использовали реагенты и растворители квалификации х.ч. и ч.д.а. Изотопная чистота  $^2H_2O$  составляла 99,8%.

Спектры  $^1H$ -ЯМР записывали на приборе Bruker WP-200-Sy (ФРГ) с рабочей частотой 200 МГц. Пробы для анализа отбирали из реакционного раствора без дополнительной очистки, кроме отделения катализатора фильтрованием.

Растворы  $NaO^2H$  готовили растворением металлического натрия в  $^2H_2O$  в атмосфере азота.

$p^2H$  растворов определяли как  $pH+0,4$ , где  $pH$  — наблюдаемое значение  $-\lg[^2H]$  в  $^2H_2O$ , определенное с помощью  $pH$ -метра, калиброванного по водным буферным растворам [16].

*Синтез катализатора SFR.* К раствору салицилальдегидной смолы в диметилформамиде (полученной по методике, аналогичной синтезу фенолформальдегидной смолы [17]) добавляли раствор фенола (20 вес. % от массы салицилальдегидной смолы) в диметилформамиде. Смесь нагревали при 150° С до образования геля, после чего охлаждали, гель отфильтровывали и промывали диметилформамидом, 0,1 н. NaOH, 0,1 н. HCl и водой. Содержание СНО-групп 7 ммоль/г. Весовая нагрузка в 0,01 н. NaOH составляет 4 г/г полимера, в диметилформамиде — 5 г/г полимера.

*Катализатор SPR* получали по методике [7] взаимодействием хлорметилированного сополимера стирола с 0,8% дивинилбензола (содержащего 22% хлора) с салициловым альдегидом в условиях реакции Фриделя — Крафта с последующим сульфированием серной кислотой. Содержащие СНО-групп 1,5 ммоль/г, SO $_3$ H-групп 1,2 ммоль/г.

*Дейтерирование дипептидов.* Навеску катализатора промывали 5 мл 1 н.  $NaO^2H$  в  $^2H_2O$ , а затем 5 мл  $^2H_2O$ . К подготовленному таким образом катализатору приливали раствор дипептида (без предварительного замещения лабильных NH- и CO $_2$ H-атомов водорода на дейтерий) и  $AlF_3$  в  $^2H_2O$ ,  $p^2H$  которого предварительно доводили до требуемой величины с помощью концентрированного раствора  $NaO^2H$  в  $^2H_2O$  (после окончания

эксперимента  $p^2H$  раствора сохранял исходную величину). Смесь раствора с катализатором перемешивали и нагревали при 60–95° С (реакцию при 122° С проводили в запаянной ампуле, нагреваемой на масляной бане) в атмосфере азота. После завершения реакции полимерный катализатор отделяли фильтрованием, после чего определяли степень дейтерирования и состав реакционного раствора.

Хроматографический анализ диепептидов и аминокислот выполняли на аминокислотном анализаторе КЛА-ЗВ с колонкой (40 см), наполненной сульфокатионитом Aminex А-5. Анализ проводили при 55° С, подвижная фаза — 0,2 н. растворы цитрата натрия с рН 3,25; 4,25 или 5,28.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Петренюк Б. В., Золотарев Ю. А., Масюков Н. Ф. Биоорганическая химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1021–1025.
2. Levine-Pinto H., Morgat J. L., Fromageot P., Meyer D., Poulin J. C., Kagan H. B. Tetrahedron, 1982, v. 38, № 1, p. 119–123.
3. Kovacs J., Jham G., Hui K. Y. J. Labelled Compounds and Radiopharm., 1982, v. 19, № 1, p. 83–93.
4. Тихонов В. Е., Ямсков И. А., Бахмутов В. И., Цыряпкин В. А., Даванков В. А. Тез. докл. VI Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов. Рига, 1983, с. 297–298.
5. Metzler D. E., Snell E. E. J. Biol. Chem., 1952, v. 198, № 1, p. 363–373.
6. Metzler D. E., Snell E. E. J. Amer. Chem. Soc., 1952, v. 74, № 4, p. 974–980.
7. Ямсков И. А., Тихонов В. Е., Даванков В. А., Вельц А. А., Рыжов М. Г., Ваучский Ю. П. Высокомолекуляр. соединения, 1980, т. XXII Б, № 2, с. 83–86.
8. Ямсков И. А., Тихонов В. Е., Даванков В. А. Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 6, с. 885–891.
9. LeMaster D. M., Richards F. M. J. Labelled Compounds and Radiopharm., 1982, v. 19, № 5, p. 639–646.
10. Kriensakul N., Mitterer R. M. Science, 1978, v. 201, № 4360, p. 1011–1014.
11. Smith G. G., DeSol B. S. Science, 1980, v. 207, № 4432, p. 765–767.
12. Smith G. G., Khatib A., Reddy G. S. J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 2, p. 293–295.
13. Browning I. G., Gillard R. D., Lyons J. R., Mitchell P. R., Phipps D. A. J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1972, № 17, p. 1815–1824.
14. Gillard R. D., Mitchell P. R., Payne N. C. Chem. Commun., 1968, № 19, p. 1150–1151.
15. Margerum D. W. Pure and Appl. Chem., 1983, v. 55, № 1, p. 23–34.
16. Covington A. K., Paabo M., Robinson R. A., Batey R. G. Anal. Chem., 1968, v. 40, № 4, p. 700–706.
17. Серенсен У., Кемпбел Т. В кн.: Препаративные методы в химии полимеров. М.: Мир, 1963, с. 354.

Поступила в редакцию  
11.VI.1984

#### REGIOSELECTIVE DEUTERATION OF DIPEPTIDES

TIKHONOV V. E., YAMSKOV I. A., BAKHMUTOV V. I.,  
TSYRYAPKIN V. A., DAVANKOV V. A.

*A. N. Nesmeyanov Institute of Organo-Element Compounds, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Deuteration of such dipeptides as Gly-Ala, Gly-Val, Gly-Trp, Gly-Leu, Ala-Ala, Ala-His, Asp-Phe, *DL*-Ala-*DL*-Ser, *DL*-Ala-*DL*-Met in  $^2H_2O$  has been carried out in the presence of polymeric catalyst containing the fragments of salicylic aldehyde. At 60–70° and  $p^2H$  12,4–12,9 in the presence of aluminium salt deuteration proceeds regioselectively at the N-terminal amino acid, exclusively in its  $\alpha$ -position. Absolute configuration of the C-terminal amino acid in dipeptides is preserved under these conditions.