



УДК 547.466:542.95

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ НА ПРИСОЕДИНЕНИЕ *трет*-БУТИЛОКСИКАРБОНИЛАМИНОКИСЛОТ К ПОЛИМЕРУ МЕРРИФИЛДА В УСЛОВИЯХ МЕЖФАЗНОГО КАТАЛИЗА И ОЦЕНКА РАЦЕМИЗАЦИИ ПРИСОЕДИНЕННОЙ АМИНОКИСЛОТЫ

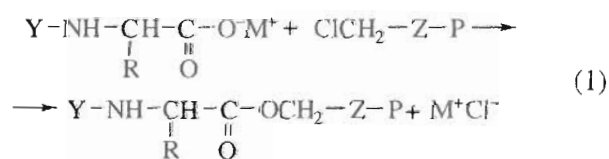
© 1995 г. С. В. Куликов, А. А. Колобов, Е. А. Кампе-Немм, Г. П. Казаков, В. М. Шпень

ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, С.-Петербург
Поступила в редакцию 26.01.94 г. После доработки 22.04.94 г.

Для уменьшения влияния водородных связей на присоединение солей ациламино кислот к хлорметиловым полимерам предложено использовать соединения, способные конкурировать за образование водородной связи. Среди растворителей лучшим в этом отношении оказался гексаметила триамид фосфорной кислоты. Использование межфазных катализаторов, содержащих протон-акцепторные группы, например бромид *п*-нитробензилтрибутиламмония, также приводит к хорошим практическим результатам. Степень рацемизации аминокислот, вводимых в полимер в условиях межфазного катализа, не превышает таковую в методе Гизина.

Ключевые слова: твердофазный синтез, полимеры, *трет*-бутилоксикарбониламино кислоты, рацемизация, межфазный катализ.

Замещение галогена в полимере Меррифилда и других галогенсодержащих полимерах является одним из путей получения аминокислотных полимеров [1, 2]. Наибольшее распространение в настоящее время получил метод Гизина, который заключается в обработке галогенсодержащего полимера цезиевой солью ациламино кислоты в DMF при 50°C [3]:



где $\text{M}^+ - \text{Cs}^+, \text{K}^+$; Y – защитная группа; Z – якорная группа; P – сополимер стирола с 1% дивинилбензола.

Присоединение аминокислот, не содержащих функциональной группы в боковой цепи, протекает с выходами 72 - 100%, в то время как аминокислоты, имеющие таковую, в этих условиях связываются с полимером значительно хуже. Поскольку количество остаточного галогена, как и количество гидроксильных групп, образовавшихся в результате гидролиза реакционноспособных группировок на полимере, определяет качество получаемого замещенного полимера [1, 2], полнота протекания реакции (1) имеет принципиально важное значение.

Для достижения более полного замещения галогена ациламино кислотой реакцию проводят в присутствии катализаторов межфазного переноса [4 - 7]. Так, в работе [7] показано, что проведение реакции между солью ациламино кислоты и хлорметиловым полимером в присутствии ТВАВ позволяет существенно увеличить степень замещения хлора. В этих условиях производные моноаминомонокарбоновых кислот замещают более 80% галогена уже при комнатной температуре. Однако производные аминокислот, имеющих дополнительную функциональную группу, реагируют неудовлетворительно. Кроме того, в условиях МФК существует принципиальная возможность отрыва протона от α -углеродного атома присоединяемой к полимеру ациламино кислоты [8], что может приводить к ее рацемизации.

Наиболее широко используемым растворителем для проведения реакции (1) является DMF. М. Монахан и соотр. [9] предложили использовать в этих целях диметилсульфоксид, однако позднее

Использованные сокращения: Acst – ацетиламидометил, DIEA – диизопропилэтиламин, DMF – диметилформамид, DMAA – диметилацетамид, HMPA – гексаметила триамид фосфорной кислоты, Mts – мезитилсульфонил, NMP – N-метилпирролидон, Papi – фенилацетиламидометил, ТВАВ – бромид тетрабутиламмония, ВТВАВ – бромид бензилтрибутиламмония, ПТВАВ – бромид *п*-нитробензилтрибутиламмония, МФК – межфазный катализ.

Адрес для переписки: 197110, С.-Петербург, ул. Пудожская, д. 7, ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, Купцову Сергею Владимировичу.

Таблица 1. Сравнение результатов присоединения калиевых и цезиевых солей Вос-аминокислот к хлорметилированному сополимеру стирола с 1% дивинилбензола в различных растворителях в течение 48 ч при 20°C при соотношении соль Вос-аминокислоты–ТВАВ–активный хлор 1.2 : 1.2 : 1*

Соль Вос-аминокислоты	DMF		DMAA		NMP		HMPA	
	б/к	ТВАВ	б/к	ТВАВ	б/к	ТВАВ	б/к	ТВАВ
Вос-Ile-OK	37	93	63	94	50	87	89	91
Вос-Gly-OK	46	82	50	96	44	89	78	93
Вос-His(Tos)-OK	41	83	41	69	33	76	61	82
Вос-Cys(Bzl)-OK	31	72	48	76	63	85	61	95
Вос-Cys(Acm)-OCs	13	43	26	69	19	52	20	85
Вос-Cys(Acm)-OK	7	41	7	69	2	52	15	85
Вос-Asn-OCs	6	20	2	31	6	28	11	50
Вос-Asn-OK	4	52	7	70	6	74	20	74
Вос-Arg(NO ₂)-OCs	6	28	6	15	7	26	7	46
Вос-Arg(NO ₂)-OK	2	41	15	59	7	46	11	69

* Приведена степень замещения хлора в полимере Меррифилда, %; б/к – без катализатора.

появилось указание на возможность окисления этим растворителем хлорметильных групп до альдегидных [10]. В других работах присоединение солей ациламино кислот к хлорметилированному полимеру осуществляли в DMAA [5, 11].

Данная работа посвящена поиску оптимальных условий присоединения ациламино кислот к хлорметилированному полимеру, оценке влияния на этот процесс растворителей, четвертичных аммониевых солей и других добавок, а также оценке степени рацемизации аминокислоты, присоединенной к полимеру в условиях катализа четвертичными аммониевыми солями.

Мы провели сравнительное изучение реакции (1) в апротонных диполярных растворителях, родственных DMF. Из данных, представленных в табл. 1, видно, что замена DMF на NMP, DMAA и HMPA приводит к возрастанию нагрузки Вос-аминокислотой. При этом в HMPA для моноаминомонокарбоновых кислот уже при комнатной температуре и даже в отсутствие катализатора были достигнуты удовлетворительные результаты. Так, калиевая соль Вос-Gly при 20°C замещала 78% хлора в полимере, а Вос-Ile – 89%. Хотя изолейцин и имеет разветвленную боковую цепь, препятствующую в ряде случаев протеканию реакций с участием этой аминокислоты, в условиях реакции (1) важное значение, по-видимому, имеет гидрофобность бокового радикала, приводящая к увеличению сорбции аминокислоты на полимере.

В случае некоторых аминокислот, имеющих дополнительную функциональную группу, выходы реакции (1) в отсутствие катализатора при использовании в качестве растворителя HMPA также выше, чем в других растворителях. Однако

если присоединение солей Вос-His(Tos) и Вос-Cys(Bzl) протекает с высокими, хотя и далекими от количественных, выходами, то присоединение таких аминокислот, как Вос-Cys(Acm), Вос-Asn, Вос-Arg(NO₂), просто неудовлетворительно.

Нагрузка полимера указанными производными аминокислот заметно возрастает при проведении реакции в условиях МФК (катализатор – ТВАВ). При этом обнаруженная тенденция к увеличению выходов в ряду DMF < NMP ~ DMAA < HMPA сохраняется. Необходимо отметить, что использование калиевых солей производных аминокислот с катализаторами межфазного переноса предпочтительнее солей цезия.

Одним из возможных объяснений увеличения выхода реакции (1) в ряду DMF < NMP ~ DMAA < HMPA может явиться изменение набухаемости полимера в этих растворителях и, как следствие, увеличение доступности реакционноспособных группировок на полимере. Действительно, оказалось, что степень набухания полимера Меррифилда (отношение объема набухшего материала к объему сухого) в ряду DMF, DMAA, NMP, HMPA возрастает и составляет 2.6; 3.3; 3.8 и 4.0 соответственно. В то же время мы обнаружили, что соли производных аминокислот уменьшают набухаемость полимера на 15 - 30%. Добавление катализатора также приводит к уменьшению набухаемости полимера на 5 - 15% в зависимости от используемого растворителя. К тому же анализ данных табл. 1 показывает, что жесткая корреляция между набухаемостью полимера и степенью замещения галогена отсутствует. Последнее, по-видимому, является следствием того, что степень набухания не единственный фактор, определяющий

Таблица 2. Влияние мочевины на присоединение калиевых и цезиевых солей Вос-аминокислот к хлорметилированному сополимеру стирола с 1% дивинилбензола в различных растворителях в течение 48 ч при 20°C при соотношении соль Вос-аминокислоты–ТВАВ–активный хлор 1.2 : 1.2 : 1*

Соль Вос-аминокислоты	DMF				НМРА			
	без добавок	мочевина**	ТВАВ	ТВАВ + мочевины**	без добавок	мочевина**	ТВАВ	ТВАВ + мочевины**
Вос-Pro-OCs	83	15(22)	85	54(36)	94	78(17)	96	89(7)
Вос-Leu-OK	24	6(75)	78	26(66)	89	56(37)	96	76(21)
Вос-Gly-OK	39	4(90)	74	41(45)	78	48(38)	93	78(16)
Вос-Asp-OK	4	0(100)	52	30(42)	20	4(80)	74	63(15)
Вос-Arg(NO ₂)-OK	2	0(100)	41	17(59)	11	0(100)	69	39(43)

* Приведена степень замещения хлора в полимере Меррифилда, %.

** В скобках указана степень ингибирования посадки производного аминокислоты мочевиной (соотношение мочевины – аминокислота = 1 : 1), %.

эффективность присоединения аминокислоты к полимеру в условиях реакции (1).

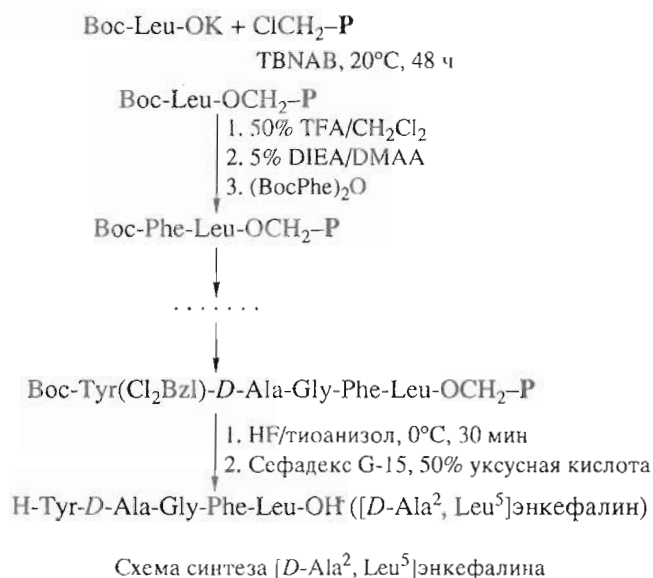
В табл. 2 представлены результаты экспериментов по присоединению первой аминокислоты к хлорметилированному полимеру в DMF и НМРА в присутствии мочевины. Оказалось, что мочевины в отсутствие катализатора ингибирует реакцию (1) в DMF в среднем на 77%. В НМРА влияние мочевины менее выражено: ингибция в отсутствие катализатора составляет лишь 54%. Катализатор межфазного переноса значительно ослабляет ингибирующее действие мочевины: выходы уменьшаются на 49 и 20% соответственно. Поскольку известно, что мочевины – сильный донор водородной связи, можно предположить, что одним из важных факторов, определяющих успешность и скорость протекания реакции (1), является возможность образования водородной связи атомом кислорода соли ациламино кислоты. Образование этой связи (в данном случае с мочевиной) приводит к существенному уменьшению отрицательного заряда на карбоксилат-анионе, т.е. к снижению нуклеофильности реагирующей частицы [12, 13], и, как следствие, к падению выхода.

DMF является апротонным диполярным растворителем, способным выступать в качестве акцептора водородной связи [14]. Однако, по-видимому, его акцепторных свойств недостаточно, если в системе имеется сильный донор водородной связи. Замена его на другие растворители подобного типа, например на NMP и DMAA, во всех случаях приводит к возрастанию нагрузки полимера ациламино кислотой. Это особенно заметно при переходе к такому сильному акцептору водородной связи, как НМРА [15, 16] (табл. 1). Проведение реакции (1) в этом растворителе, даже в присутствии мочевины, дает удовлетворительные результаты.

В литературе, относящейся к растворам, различают три типа водородных связей: 1) связи между молекулами растворителя и молекулами растворенного вещества; 2) связи между молекулами растворенного вещества и 3) внутримолекулярные связи. При использовании апротонных диполярных растворителей, являющихся акцепторами водородных связей, первый тип водородных связей не мешает прохождению нуклеофильных реакций. В то же время растворитель, обладающий ярко выраженными протон-акцепторными свойствами, способен разрушать водородные связи второго типа. Как нам кажется, именно этим объясняется увеличение выходов реакции (1) при переходе от DMF к НМРА (табл. 1). Внутримолекулярные водородные связи, по-видимому, практически нацело сохраняются во всех рассмотренных растворителях. Образование внутримолекулярных водородных связей в производных аспарагиновой кислоты показано в работе [17], сильные водородные связи обнаруживаются в аргинине и его производных [18, 19]. По нашему мнению, неудовлетворительные выходы реакции (1) в случае аминокислот, имеющих дополнительную функциональную группу, даже при использовании таких растворителей, как DMAA и НМРА (табл. 1), также могут быть обусловлены сильными внутримолекулярными водородными связями, которые и тормозят реакцию замещения галогена полимера.

Предположение о влиянии водородной связи на полноту протекания реакции (1) заставляет по-новому взглянуть на механизм катализа четвертичными аммониевыми солями.

Ранее отмечалось, что механизм катализа взаимодействия нерастворимого полимера с солью ациламино кислоты заключается в создании высокой локальной концентрации аниона-нуклеофила на поверхности полимера за счет сорбции четвертичной соли с последующей сорбцией аниона [20].



Однако представляется вполне вероятным, что четвертичная соль, участвующая в переносе ациламинокислоты к полимеру, может предотвращать образование водородной связи карбоксилат-анионом. Результатом этого является дополнительное ускорение реакции (1) и возрастание степени замещения галогена (табл. 1, 2).

Учитывая сказанное, мы предположили, что если акцептор водородной связи будет находиться в непосредственной близости от аниона, то он

будет более эффективно способствовать разрушению водородной связи в производных аминокислот. Для проверки этого предположения мы использовали NTBAB и BTBAB. Первый содержит нитрогруппу, которая может выступать в роли акцептора водородной связи и, следовательно, способствовать ее разрушению в производных аминокислот. Второй содержит незамещенный бензильный радикал и может способствовать лишь усилению сорбции четвертичной соли на стирол-дивинилбензольном полимере.

Применение BTBAB не выявило существенных преимуществ его использования по сравнению с TBAB (табл. 3). В то же время проведение реакции в присутствии NTBAB как в DMF, так и в DMAA давало более высокую нагрузку, чем в присутствии TBAB и BTBAB. Увеличение нагрузки полимера было особенно значительным в случае аминокислот, содержащих функциональную группу в боковой цепи.

Таким образом, в ряду исследованных бромидов четвертичного аммония NTBAB оказался наиболее эффективным. Вероятно, его влияние определяется двумя факторами: 1) высокой склонностью к сорбции на полимере и 2) участием нитрогруппы в разрушении водородной связи карбоксилат-анионом.

Для определения степени рацемизации при присоединении производных аминокислот к полимеру в условиях МФК нами был использован метод, основанный на хроматографическом раз-

Таблица 3. Сравнение присоединения калиевых солей Вос-аминокислот к хлорметилированному сополимеру стирола с 1% дивинилбензола с различным содержанием хлора в DMF и DMAA в присутствии различных четвертичных солей аммония при 20 и 50°C в течение 48 ч при соотношении соль Вос-аминокислоты – катализатор – активный хлор 1.2 : 1.2 : 1

Соль Вос-аминокислоты	Исходное содержание хлора, г-ат/г*	Температура, °C	Степень замещения, %				
			DMF			DMAA	
			TBAB	BTBAB	NTBAB	TBAB	NTBAB
Boc-Leu-OK	0.54	20	78	89	83	91	94
Boc-Gly-OK	0.54	20	82	74	91	96**	91
Boc-Gln-OK	0.54	20	70	42	72	70	70
Boc-Asn-OK	0.54	20	52	43	59	70	72
Boc-Arg(NO ₂)-OK	0.54	20	41	39	52	37	56
Boc-Arg(Mts)-OK	1.19	50	–	–	–	59	67**
	0.54	20	22	2	44	37	48
	0.54	50	–	–	–	71	85**
Boc-Cys(Asm)-OK	0.90	50	–	–	–	33	87**
	0.54	20	41	23	46	69	67
	0.54	50	–	–	–	78**	78
	0.90	50	–	–	–	74**	81

* Содержание активного хлора определяли методом Фольгарда.

** Препаративная наработка аминокцилполимера (от 5 до 40 г хлорметилированного полимера).

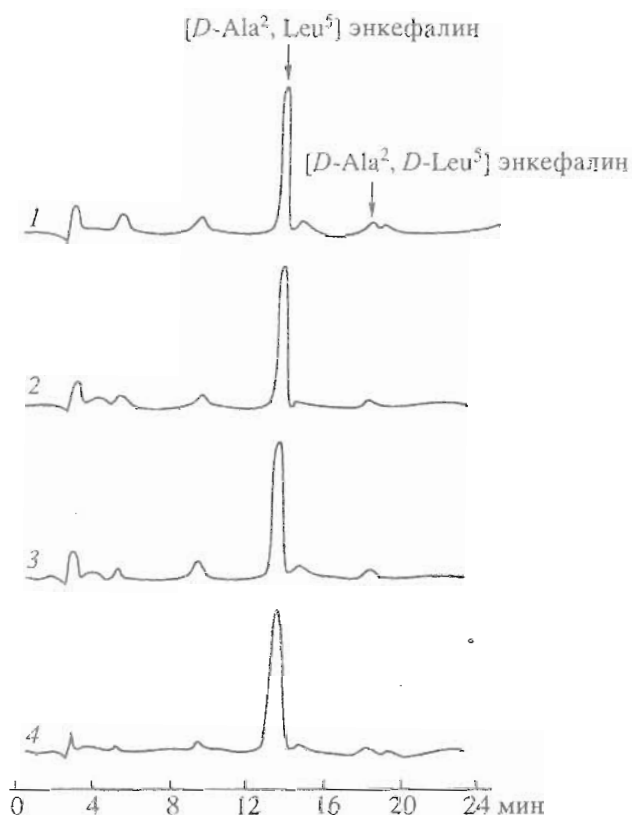
делении и количественном определении диастереомеров. На Вос-Leu-полимерах, полученных с использованием четвертичных аммониевых солей в качестве катализаторов, был осуществлен синтез $[D\text{-Ala}^2, \text{Leu}^5]$ энкефалина (схема). В качестве репера по той же схеме был приготовлен $[D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалин.

Синтез проводили на синтезаторе пептидов Applied Biosystems 430A в автоматическом режиме. После деблокирования безводным фтористым водородом и обессоливания пептиды анализировали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (рисунок). Степень рацемизации оценивали по содержанию $[D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалина в конечном продукте. В качестве контроля аналогичные синтезы $[D\text{-Ala}^2, \text{Leu}^5]$ энкефалина были проведены на полимере, полученном по методу Гизина, а также на Вос-Leu-полимерах фирм Applied Biosystems и Vega. Оказалось, что во всех случаях конечный продукт содержит 1.2 - 1.6% $[D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалина (рисунок). Таким образом, рацемизация лейцина при присоединении его Вос-производного к хлорметилированному полимеру в условиях МФК не превышает таковую в методе Гизина.

Обобщая полученные данные, подчеркнем, что заметное влияние на присоединение солей ациламинокислот к хлорметилированным полимерам оказывают водородные связи. Для уменьшения их влияния на реакцию (1) следует использовать растворители, являющиеся акцепторами водородной связи; лучший из них – тексаметилтриамид фосфорной кислоты. Полезным оказывается использование катализаторов, в молекулу которых введены протон-акцепторные группы, способные конкурировать за образование водородной связи. Степень рацемизации аминокислот, вводимых в полимер в условиях МФК, не превышает таковую в методе Гизина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использован хлорметилированный сополимер стирола с 1% дивинилбензола с различным содержанием хлора и Вос-аминокислоты фирмы Fluka (Германия). Дидиклогексилкарбодимид, 1-гидроксibenзотриазол, триэтиламин и трифторуксусная кислота получены от фирмы Merck и использованы без дополнительной очистки. Растворители перегоняли в вакууме и хранили над молекулярными ситами 4A. Соли Вос-аминокислот готовили по методике [3] с учетом рекомендаций, изложенных в работе [11]. Нагрузку полимера определяли с помощью пикринового теста [21]. Твердофазный синтез пептидов проводили на автоматическом синтезаторе пептидов Applied Biosystems, модель 430A, используя стандартный пакет программ (версия 1.40). Отщепление пептида от полимера осуществляли 90% без-



Хроматограммы ВЭЖХ препаратов $[D\text{-Ala}^2, \text{Leu}^5]$ энкефалина, синтезированных на Вос-Leu-полимере, полученном по методике МФК (1) и по методу Гизина (2), на полимере фирмы Applied Biosystems (Вос-Leu-Пал-полимер) (3) и фирмы Vega (4).

водным фтористым водородом в присутствии тиоанизола. После упаривания HF реакционную массу промывали эфиром и подвергали экстракции 50% CH_3COOH . Полученные препараты обессоливали на колонке (3.2 × 45 см) с сефадексом G-15 в 50% уксусной кислоте. Хроматографическое разделение пептидов проводили на колонках Delta Pac C18 (300 Å, 12 мкм, 4.6 × 150 мм), используя градиент (20 - 30%, 20 мин) ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте; скорость элюции 1 мл/мин, детекция при 220 нм (хроматограф Gilson, Франция). Полученные пептиды охарактеризованы аминокислотным анализом.

Взаимодействие солей Вос-аминокислот с хлорметилированным сополимером стирола с дивинилбензолом. К 200 мг полимера добавляли соответствующее количество соли Вос-аминокислоты, катализатора и добавки (табл. 1 - 3) и 1.5 мл соответствующего растворителя. Суспензию встряхивали при 20 или 50°C в течение 48 ч. Полимер отфильтровывали, промывали DMF (3 × 3 мл), смесью DMF – вода, 9 : 1 (3 × 3 мл), DMF (3 × 3 мл), этанолом (3 × 5 мл) и высушивали в вакууме. Степень замещения определяли с помощью пикринового теста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. V. 2 / Eds Gross E., Meienhofer J. N. Y.; L.: Acad. Press, 1983. P. 73.
2. Birr C. Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis. B.: Springer-Verlag, 1978. P. 17 - 20, 57.
3. Gisin B.F. // Helv. chim. acta. 1973. V. 50. № 5. P. 1476 - 1482.
4. Roeske R.W., Gesellchen P.D. // Tetrahedron Lett. 1976. № 38. P. 3369 - 3372.
5. Colombo R., Atherton E., Sheppard R.C., Woolly V. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1983. V. 21. № 2. P. 118 - 126.
6. Horiki R., Igano K., Ihonye K. // Chem. Lett. 1978. № 2. P. 165 - 168.
7. Куликов С.В., Соколова Н.Ю., Леонова Е.Б., Самарцев М.А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 3. С. 348 - 353.
8. Демлов Э., Демлов З. Межфазный катализ. М.: Мир, 1987. С. 192 - 196.
9. Monahan M.W., Gilon C. // Biopolymers. 1973. V. 12. № 11. P. 2513 - 2519.
10. Frechet J.M.J., de Smat V.D., Farral M.J. // J. Org. Chem. 1979. V. 44. № 11. P. 1774 - 1779.
11. Giralt E., Celme C., Ludevid V.D., Pedroso E. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1987. V. 29. № 5. P. 647 - 656.
12. Садеков И.Д., Минкин В.И., Луцкий А.Е. // Успехи химии. 1970. Т. 39. № 3. С. 380 - 411.
13. Rosenfeld J.M., Yeroushalmi S., Oseitwum T.J. // Analyt. Chem. 1986. V. 58. № 14. P. 3044 - 3047.
14. Maran F., Severin M.G., Vianello E. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 51. P. 7523 - 7526.
15. Normann H. // Bull. Soc. chim. France. 1968. № 2. P. 791 - 826.
16. Abraham M.H., Grellier P.L., Prior D.V., Duce P.P., Morris J.J., Taylor P.J. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1989. № 6. P. 699 - 711.
17. Salunke D.M., Vijayan M. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1981. V. 18. № 3. P. 348 - 351.
18. Smith R.J., Williams D.H., James K. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1989. № 11. P. 682 - 683.
19. Albini N., Anricchio S., Minisci F., Manga A. // Chem. Ind. 1985. № 14. P. 484 - 485.
20. Takeishi M., Naito Y., Okawara M. // Angew. Macromolec. Chem. 1973. V. 28. P. 111 - 119.
21. Gisin B.F. // Analyt. chim. acta. 1972. V. 58. № 1. P. 248 - 249.

Influence of Some Factors on *tret*-Butyloxycarbonyl Amino Acids Attachment to Merrifield Polymer in Interphase Catalysis Conditions and Evaluation of Racemization of Loaded Amino Acid

S. V. Kulikov*, A. A. Kolobov, E. A. Kampe-Nemm,
G. P. Kazakov, and V. M. Shpen

Institute of Highly Pure Biopreparations, St.-Petersburg, 197110, Pudozhskaya str., 7

Abstract – In order to reduce the influence of hydrogen bonds on the acylamino acid salts attachment to the chloromethylated resin, it is proposed to use compounds that can compete for the hydrogen bonds formation. The best solvent proved to be hexamethylphosphoric triamide. Use of interphase catalysts, e.g., tributyl-*p*-nitrobenzyl ammonium, also gives good results. The racemization degree of the amino acids attached to solid support by means of the interphase catalysis does not exceed that of amino acids loaded on the polymer according to Gisin's method.

Key words: solid phase synthesis, polymers, *tret*-butyloxycarbonyl amino acids, racemization, phase transfer catalysis.

* Author for correspondence.