



УДК 541.128.1+577.15.02

УСТОЙЧИВОСТЬ ФЕНИЛГИДРАЗИДНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ, БЛОКИРУЮЩЕЙ БОКОВЫЕ КАРБОКСИЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ АСПАРАГИНОВОЙ И ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТ, В УСЛОВИЯХ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ

© 1995 г. А. Н. Семенов

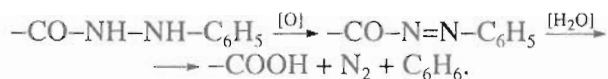
Совместное российско-германское предприятие "Константа", 123056, Москва, Грузинский пер., 3/2

Поступила в редакцию 09.06.94 г.

Изучена стабильность фенилгидразидной защитной группы, блокирующей боковые карбоксильные функции аспарагиновой и глутаминовой кислот, в условиях, имитирующих реакционную среду отдельных стадий твердофазного синтеза пептидов. Показана устойчивость фенилгидразидной группы в условиях удаления Вос- и Fmoc-защитных групп и при ацилировании избытками активированных эфиров (пентафторфениловых и гидроксibenзотриазоловых), но нестабильность в реакциях с ангидридами в присутствии оснований.

Ключевые слова: фенилгидразидная защитная группа, твердофазный синтез пептидов.

Фенилгидразидная защитная группа, блокирующая карбоксильную функцию, известна еще с 50-х годов. Тем не менее эта защита не получила широкого распространения в практике пептидного синтеза из-за жестких окислительных условий ее снятия:



В предыдущих работах [1, 2] мы показали, что для мягкого удаления фенилгидразидной защитной группы в окислительных условиях можно использовать в качестве катализаторов ферменты класса оксидоредуктаз – пероксидазу или лакказы (в случае водорастворимых пептидов) [1, 2] или комплексы меди с азотсодержащими лигандами, имитирующими активный центр лакказы (в случае водонерастворимых пептидов) [3, 4]. Каталитическое деблокирование протекает в мягких условиях, исключающих удаление других защитных групп или окисление лабильных аминокислот (метионин, триптофан, тирозин, гистидин). Предложенный способ мягкого каталитического удаления фенилгидразидной защитной группы позволил реализовать новую схему синтеза ключевого фрагмента (1 - 16) кальцитонина лосося [5, 6]; также завершается разработка простой схемы синтеза [Lys⁸]вазопрессина. Можно с уверенностью сказать, что фенилгидразидная защитная группа имеет безусловные перспективы для использования в практике рутинного синтеза пептидов в растворе.

Используемые сокращения: НОВt – N-гидроксibenзотриазол, Fmoc – флуоренилметилоксикарбонил, Pfr – пентафторфенил, Glp – пироглутаминовая кислота.

Насколько нам известно, до настоящего времени не описаны попытки использовать фенилгидразидную защитную группу для твердофазного синтеза пептидов. В то же время следует признать, что проблема эффективной защиты боковых карбоксильных функций аспарагиновой и/или глутаминовой кислот еще далека от разрешения. В каталогах ведущих фирм-производителей реактивов для твердофазного синтеза пептидов представлены три вида производных аспарагиновой и глутаминовой кислот по ω-карбоксильным функциям – трет-бутиловые, бензильные и циклогексильные эфиры. Для их деблокирования используются кислотные условия разной степени жесткости. В то же время в твердофазном синтезе большое распространение находят кислотоллабильные и гиперкислотоллабильные якорные группы [7]. Очевидно, что в комбинации таких якорных групп с коммерчески доступными защищенными аминокислотами невозможно удалить боковую защитную группу аспарагиновой/глутаминовой кислоты без снятия пептида со смолы. А селективное деблокирование Asp/Glu может быть необходимо для синтеза N-гликопептидов [8] или иной модификации боковой карбоксильной группы аспарагиновой/глутаминовой кислот в процессе твердофазного синтеза. В связи с этим представляется перспективным использование фенилгидразидной группы для защиты боковых карбоксильных функций аспарагиновой и глутаминовой кислот при синтезе пептидов.

Цель настоящей работы – изучение устойчивости фенилгидразидной защитной группы в условиях, имитирующих реакционную среду стадий

твердофазного синтеза пептидов. Под стадиями твердофазного синтеза пептидов будем понимать следующее: деблокирование α -аминогруппы трифторуксусной кислотой (25% раствор в хлороформе или хлористом метиле в течение 30 мин) с последующей нейтрализацией триэтиламино (10% раствор в хлороформе в течение 3 мин) для Вос-версии временной защиты α -аминогрупп или пиперидином (20% раствор в DMF в течение 10 мин) для Fmoc-версии временной защиты α -аминогруппы; конденсация с избытком ацилирующего агента в одной из трех наиболее популярных в настоящее время модификаций (симметричные ангидриды в присутствии диизопропилэтиламина, пентафторфениловые эфиры и эфиры N-гидроксисбензотриазола); ацилирование непрореагировавших аминогрупп уккусным ангидридом в присутствии триэтиламина.

По-определению фенилгидразидная защитная группа, блокирующая боковые карбоксильные функции глутаминовой и аспарагиновой кислот, должна быть удалена до отщепления пептида со смолы. Поэтому устойчивость этой защитной группы в условиях тотального деблокирования и/или отщепления пептидов со смолы не изучалась.

В литературе давно описана побочная реакция, характерная для N-концевого глутамин, — его циклизация в остаток пироглутаминовой кислоты [9]. Производные глутаминовой кислоты, боковые карбоксильные функции которых защищены фенилгидразидной группой, химически в известной степени подобны глутамину. Поэтому в данной работе исследовалась также устойчивость защищенной N-концевой глутаминовой кислоты в условиях катализируемого слабыми кислотами процесса циклизации.

В качестве модельных соединений использовали простейшие производные аспарагиновой и глутаминовой кислот — Z-Asp(NHNHC₆H₅)-NHCH₃ и

Z-Glu(NHNHC₆H₅)-NHCH₃. Результаты исследования устойчивости этих производных в условиях, имитирующих условия твердофазного синтеза пептидов, представлены в таблице.

Деблокирование в кислой среде. Как видно из таблицы, фенилгидразидная защитная группа полностью устойчива в условиях удаления Вос-группы (опыт 1). При продолжительности (согласно стандартному протоколу) одного цикла деблокирования 30 мин [10] устойчивость фенилгидразидной защиты достаточна для проведения по крайней мере 48 циклов.

Нейтрализация триэтиламино. В присутствии триэтиламина не наблюдается характерной для бензильной защитной группы (описанной на примере Вос-Asp(OBzl)-X [11]) реакции циклизации (опыт 4).

Деблокирование пиперидином. Фенилгидразидная группа устойчива в условиях удаления Fmoc-группы в течение 6 ч (см. рис. 1, 1), что достаточно для проведения 36 циклов [10]. Тем не менее при длительной инкубации в 20% пиперидине фенилгидразидная группа не вполне устойчива (рис. 1, 1; таблица, опыт 2). Предварительные исследования (не приводятся) позволили сделать предположение, что нестабильность фенилгидразидной группы в присутствии пиперидина связана с ее окислением кислородом воздуха в щелочной среде. В связи с этим было изучено влияние восстановителей на устойчивость фенилгидразидной группы в среде, содержащей 20% пиперидина. Данные таблицы (опыт 3) и рис. 1 указывают на то, что в присутствии восстановителей устойчивость фенилгидразидной группы возрастает. Так, в присутствии 5% меркаптоэтанола защитная группа сохраняется в течение 24 ч (144 цикла) [10] (рис. 2), т.е. она более устойчива, чем бензильная защита [12].

Устойчивость Z-Asp(NHNHC₆H₅)-NHCH₃ (1) и Z-Glu(NHNHC₆H₅)-NHCH₃ (2) в условиях, имитирующих стадии твердофазного синтеза пептидов*

Номер опыта	Условия обработки (24 ч)	Устойчивость, %	
		(1)	(2)
1	25% TFA в хлороформе	100	100
2	20% пиперидина в DMF	47	74
3	20% пиперидина +1% меркаптоэтанола в DMF	70	100
4	10% TEA в хлороформе **	100	100
5	Z-Gly/HOBt (25 : 1)/диизопропилкарбодимид	100	100
6	Вос-Ala-OPfp (10 : 1)	100	100
7	Ac ₂ O (10 : 1) в присутствии Pr ₂ EtN	65.7	90.4
8	Ac ₂ O (10 : 1) в присутствии Et ₃ N	63.2	75.3

* Соотношение реагентов взяты согласно рекомендациям стандартного протокола [10]; в скобках приведен избыток ацилирующего реагента.

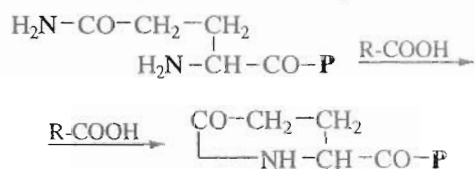
** Время обработки 3 ч.

Кроме того, следует указать, что конструкция практически всех современных автоматических синтезаторов пептидов предполагает проведение реакций в инертной атмосфере (в отсутствие кислорода). Следовательно, можно сделать вывод о совместимости фенилгидразидной группы и Fmoc-защиты.

Ацилирование избытком ацилирующего агента. При проведении твердофазного синтеза пептидов для получения высокого выхода на каждой стадии практикуется использование избытка высокореакционных ацилирующих агентов и/или их повторное использование (так называемый *recoupling*) [10]; для блокирования непрореагировавших аминогрупп используют высокореакционную систему уксусный ангидрид – триэтиламин [10]. В литературе имеются сведения, что атомы азота фенилгидразидной группы в достаточно жестких условиях могут быть проацилированы [13]. В связи с этим была изучена устойчивость фенилгидразидной группы по отношению к различным ацилирующим агентам, используемым в стандартных протоколах твердофазного синтеза пептидов. Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что фенилгидразидная группа не взаимодействует с пентафторфениловыми (опыт 6) и гидроксibenзотриазоловыми (опыт 5) эфирами аминокислот. В то же время уксусный ангидрид в присутствии оснований взаимодействует с фенилгидразидной группой, при этом более устойчиво производное глутаминовой кислоты (опыты 7 и 8).

Следовательно, при использовании фенилгидразидной группы для защиты боковых функций аспарагиновой и глутаминовой кислот нужно избегать применения ангидридов как на стадии синтеза пептидной связи, так и для блокирования непрореагировавших аминогрупп.

Образование пироглутаминовой кислоты. Известно, что N-концевой остаток глутамин в присутствии слабых кислот (например, Вос-аминокислот) претерпевает циклизацию с образованием остатка пироглутаминовой кислоты [9]. Это приводит к обрыву цепи и образованию “неправильной” последовательности при синтезе:



P – полимер

Аналогичный процесс может происходить и в случае N-концевого остатка глутаминовой кислоты, боковая карбоксильная функция которой защищена фенилгидразидной группой. Для исследования возможности протекания этой побочной реакции был использован дипептид $\text{Glu}(\text{NHNHC}_6\text{H}_5)\text{-Phe-NH}_2$. Его обработка 20%

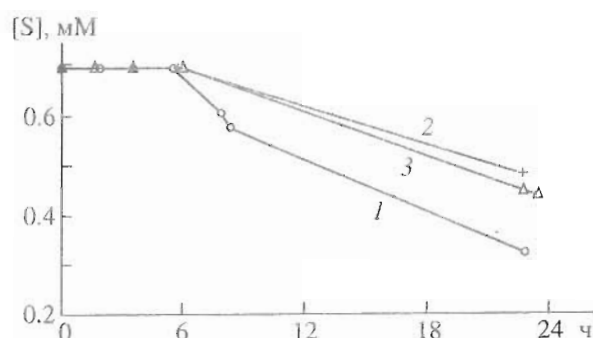


Рис. 1. Устойчивость фенилгидразидной группы Z-Asp(NHNHC₆H₅)-NHCH₃ (S) в 20% пиперидине в DMF в отсутствие (1) и присутствии восстановителей – 1% меркаптоэтанола (2) или 1% аскорбиновой кислоты (3).

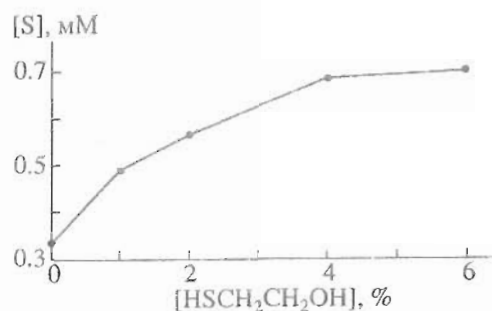


Рис. 2. Зависимость от концентрации меркаптоэтанола устойчивости фенилгидразидной группы Z-Asp(NHNHC₆H₅)-NHCH₃ в 20% пиперидине в DMF (время реакции 24 ч).

уксусной кислотой в течение 48 ч не привела к циклизации, в то время как модельный дипептид Glp-Phe-NH_2 в идентичных условиях на 50% превратился в Glp-Phe-NH_2 .

Следовательно, N-концевая глутаминовая кислота, боковая карбоксильная функция которой защищена фенилгидразидной группой, не склонна к циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты.

Таким образом, приведенные экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что фенилгидразидная защитная группа, блокирующая боковые карбоксильные функции аспарагиновой и глутаминовой кислот, совершенно устойчива в условиях удаления Вос-группы, достаточно устойчива в условиях удаления Fmoc-группы и не склонна к циклизации с образованием остатка пироглутаминовой кислоты. Присутствие фенилгидразидной группы позволяет использовать в качестве ацилирующих агентов *para*-нитрофениловые [5, 6], пентафторфениловые и гидроксibenзотриазоловые эфиры, но не ангидриды.

Эти результаты позволяют предположить, что не существует принципиальных ограничений для использования фенилгидразидной группы в качестве временной защиты для боковых карбоксильных функций аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Главные достоинства данной защитной группы: 1) фенилгидразидная защитная группа совместима как с Boc-, так и с Fmoc-стратегией твердофазного синтеза пептидов, что позволяет в процессе синтеза менять тип защит для α -аминогруппы и, таким образом, расширяет возможности при планировании тактики синтеза конкретного пептида; 2) удаление фенилгидразидной группы может быть выполнено в исключительно мягких условиях, что позволяет деблокировать карбоксильные группы для их последующей модификации без отщепления синтезируемого пептида со смолы и с сохранением всех прочих защитных групп.

Можно предположить, что наиболее предпочтительными областями использования фенилгидразидной защитной группы будут твердофазный синтез модифицированных пептидов (например, N-гликопептидов), разветвленных пептидов или пептидов, содержащих циклические фрагменты с участием боковых карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали аминокислоты, дихлоргексилкарбодиимид, диизопропилкарбодиимид, трифторуксусную кислоту, ацетонитрил, пиперидин, триэтиламин, N-гидроксибензотриазол (Fluka), фенилгидразин (Aldrich), меркаптоэтанол и пластинки для ТСХ DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (Merck), неорганические соли, органические растворители, аскорбиновую кислоту ("Реахим").

Исходные производные аспарагиновой и глутаминовой кислот были синтезированы из соответствующих аминокислот или их производных методом DCC/NOBt. Устойчивость производных анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе Gilson с использованием колонки (4.6 × 250 мм) Chromatronic ODS в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.05 М фосфате натрия, pH 3.0. Для

количественной обработки хроматограмм использовали интегратор Shimadzu C-R6A.

Для изучения устойчивости фенилгидразидной защитной группы в 20% пиперидине в присутствии и в отсутствие восстановителей 0.6 мг Z-Asp(NHNH-C₆H₅)-NHCH₃ растворяли в смеси 1.6 мл DMF и 0.4 мл пиперидина и добавляли определенное количество восстановителя. Реакционную смесь инкубировали в условиях, обеспечивающих свободный доступ кислорода воздуха, и через определенные промежутки времени определяли содержание Z-Asp(NHNH-C₆H₅)-NHCH₃ в реакционной смеси методом количественной ВЭЖХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенов А.Н., Ломоносова И.В., Березин В.И., Титов М.И. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17, № 8. С. 1074 - 1076.
2. Semenov A.N., Lomonosova I.V., Berезin V.I., Titov M.I. // Biotechnol. Bioeng. 1993. V. 42, № 10. P. 1137 - 1141.
3. Семенов А.Н., Ломоносова И.В., Титов М.И. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19, № 1. С. 66 - 74.
4. Semenov A.N., Lomonosova I.V., Titov M.I. // Peptide Res. 1992. V. 5, № 5. P. 300 - 304.
5. Семенов А.Н., Ломоносова И.В. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19, № 2, С. 182 - 189.
6. Semenov A.N., Lomonosova I.V. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1994. V. 43, № 2. P. 113 - 117.
7. Albericio F., Barany G. // Tetrahedron Lett. 1991. V. 32, № 8. P. 1015 - 1018.
8. Kunz H. // Pure Appl. Chem. 1993. V. 65, № 6. P. 1223 - 1232.
9. Bodansky M., Martinez J. // The Peptides. V. 5 / Eds E. Gross, J. Meienhofer. N.Y.: Acad. Press, 1983. P. 111 - 216.
10. Stewart J.M., Young J.D. Solid Phase Peptide Synthesis. 2nd Ed. Rockford: Pierce Chem. Comp., 1984. P. 71 - 83.
11. Bodanszky M., Kwei J.Z. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1978. V. 12, № 1. P. 69 - 74.
12. Schon I., Colombo R., Csehi A. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1983. P. 504 - 507.
13. Позднеев В.Ф. // Журн. орган. химии. 1977. Т. 1, № 1. С. 2531 - 2535.

Stability of the Phenylhydrazide Protecting Group for Side-chains of Glutamic and Aspartic Acids in Conditions of Solid-Phase Synthesis

A. N. Semenov

Konstanta Joint Russian-German Enterprise, per. Gruzinskii 3/2, Moscow, 123056 Russia

Abstract – Stability of the phenylhydrazide protecting group for side chains of aspartic and glutamic acids was investigated in conditions that imitated the reaction media of several steps of solid-phase peptide synthesis. The group was shown to be stable during the removal of Boc- and Fmoc-protection and during acylation by an excess of active esters (pentafluorophenyl or hydroxybenzotriazole esters). However carboxylic anhydrides could affect this protecting group in the presence of bases.

Key words: phenylhydrazide protecting group, solid-phase peptide synthesis.