



УДК 577.112.6.057:542.95

***n*-СУЛЬФОТЕТРАФТОРФЕНИЛОВЫЕ ГИДРОФИЛЬНЫЕ АКТИВИРОВАННЫЕ ЭФИРЫ АМИНОКИСЛОТ В ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ**

© 1995 г. В. Н. Медведкин[#], В. Ф. Заболотских*, Е. А. Пермяков**, Ю. В. Митин, М. Н. Сорокина*, Л. В. Клименко

Институт белка РАН, 142292, Пушкино Московской обл.;

* Пермский филиал ГНЦ "Прикладная химия", Пермь;

** Институт биологического приборостроения РАН, Пушкино Московской обл.

Поступила в редакцию 4.11.94 г. После доработки 25.04.95 г.

Высокорекреационноспособные гидрофильные ("водорастворимые") *n*-сульфотетрафторфениловые эфиры (Tfs-эфиры) предложены для пептидного синтеза в водной и водно-органической среде, а также для полусинтеза белков и пептидов в водной среде. Указанные эфиры могут служить основой для создания серии реагентов для химической модификации белков. Являясь аналогами прекрасно зарекомендовавших себя пентафторфениловых эфиров, Tfs-эфиры обладают высокой реакционной способностью в сочетании с хорошей стабильностью при хранении. Показано, что выражение для скорости реакции (для субстратов AA₁ и AA₂) имеет вид: $v = k[\text{Вос-AA}_1\text{-OTfs}][\text{H-AA}_2\text{-NH}_2]^{0.5}$ как для воды, так и для DMF, т.е. реакция не является обычной реакцией второго порядка. При этом скорость реакции в воде лишь ненамного ниже, чем в DMF.

Ключевые слова: пептидный синтез, гидрофильные активированные эфиры, *n*-сульфотетрафторфениловые эфиры, кинетика и порядок реакции.

Изучение процесса образования пептидной связи в воде – одна из фундаментальных задач современной биоорганической химии. Осуществление реакции пептидного синтеза в водной среде всегда сопровождается гидролизом активированного эфира аминокислоты, снижающим выход целевого продукта конденсации. Однако эта реакция конкурентно предотвращает еще более нежелательные побочные процессы *O*- и *S*-ацилирования в случае незащищенных боковых функций аминокислот, переэтерификации с карбоксила на карбоксил и некоторые другие. Изучению побочных реакций пептидного синтеза в водной среде посвящена, например, работа [1]. Важным фактором в пользу исследований положительных и отрицательных моментов пептидного синтеза в водной или водно-органической среде является перспектива его промышленного использования благодаря экологической безопасности технологии: водорастворимость компонентов делает возможным применение высокоэффективных установок обратного осмоса для очистки технологических сбросов.

Сокращения: Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил, Pfr – пентафторфенил, Tfc – *n*-хлортетрафторфенил; Tfr – 2,3,5,6-тетрафторфенил; Tfs – *n*-сульфотетрафторфенил, Na-соль; Trf – 2,3,5-трифторфенил; Nsp – 2-нитро-4-сульфофенил.

[#] Автор для переписки.

Тактика минимальной защиты, необходимая для синтеза в водных средах, впервые реализованная Хиршманом [2], не получила развития, в частности, из-за отсутствия эффективного и стабильного гидрофильного активированного производного аминокислот. В основном тактика минимальной защиты используется в экспериментах по полусинтезу пептидов и белков [3], где стандартная методология пептидного синтеза адаптирована к работе с объектами, растворимыми только в воде. При этом методики, предлагаемые в монографии Оффорда [3], как правило, более применимы к работе в безводной среде, а добавление воды рассматривается как неизбежный и вынужденный фактор.

Современные методы масс-спектрометрии позволяют однозначно решать проблему определения гидрофильных активированных эфиров и изучать механизм пептидного синтеза в водной среде столь же эффективно, как это делается в классическом пептидном синтезе.

Стремление использовать в качестве водорастворимых эфиров аминокислот гидрофильные аналоги хорошо изученных активированных эфиров является логически понятным шагом. В настоящей работе описываются новые активированные *n*-сульфотетрафторфениловые (Tfs) эфиры аминокислот (точнее, их натриевые или калиевые

соли по сульфогруппе), которые являются гидрофильными аналогами пентафторфениловых эфиров [4]. Tfs-эфиры наиболее реакционноспособны из всех описанных к настоящему времени гидрофильных эфиров и к тому же имеют лучшее соотношение скорости аминолиза к скорости гидролиза по сравнению с малоактивными 2-нитро-4-сульфофениловыми эфирами (Nsp-эфиры) [5]. Nsp-эфиры применялись нами в предшествующих экспериментах [6], которые стали первым примером использования водорастворимых активированных эфиров аминокислот для полусинтеза белкового фрагмента.

По своей реакционной способности в водно-органической среде к Tfs-эфирам близки 3-сульфо-*N*-оксисукцинимидные эфиры [7]. Но при работе с последними следует опасаться известной побочной реакции раскрытия сукцинимидного кольца и включения производного янтарной кислоты в растущую полипептидную цепь [8, 9]. Поэтому мы предложили гидрофильный аналог пентафторфениловых эфиров, содержащий сульфогруппу в *para*-положении фторароматического кольца. Исходный *n*-сульфотетрафторфенол получали стандартным сульфированием 2,3,5,6-тетрафторфенола олеумом при повышенной температуре (80 - 100°C) аналогично [10]. Детальное описание методики в данной работе не приведено, так как исследование проводилось в заводских условиях, пока не оптимизированных. Сульфотетрафторфенол легко выделяется в виде монокристаллической соли (хорошо сформированные кристаллы сиреневого цвета) при доведении рН раствора до 3 - 4 раствором 1 М NaOH в полунасыщенном растворе NaCl и охлаждении до 3 - 5°C. После промывки полученных кристаллов хлороформом и последующей перекристаллизации из спирта с эфиром получают натриевую соль *n*-сульфотетрафторфенола в виде длинных бесцветных игл с выходом 60 - 70% из расчета на массу сырой реакционной смеси. Структура препарата и его гомогенность доказана методом ¹⁹F-ЯМР (данные не приведены).

Tfs-эфиры аминокислот мы получали взаимодействием производного аминокислоты с эквивалентом натриевой соли *n*-сульфотетрафторфенола в среде DMF с использованием *N,N'*-дициклогексилкарбодимида в качестве конденсирующего реагента. Присутствие иона натрия затрудняет проведение элементного анализа. По той же причине неинформативным становится такой параметр, как температура плавления (все производные разлагаются при температуре выше 200°C). Ограниченная растворимость Tfs-эфиров в большинстве органических растворителей затрудняет их очистку стандартными методами перекристаллизации. Экстракция неприменима по той же причине. В этой связи основной характеристикой полученных соединений являются данные масс-

спектрометрии в сочетании с индивидуальностью препарата при анализе ТСХ, а наиболее надежным способом препаративной очистки оказалась колоночная хроматография на сефадексе LH-20 с использованием в качестве элюента метанола или этанола. Наличие активированной сложной эфирной связи подтверждено с помощью инфракрасной спектрометрии (интенсивная полоса 1792 см⁻¹). Выход и свойства некоторых полученных нами Tfs-эфиров приведены в табл. 1.

Одной из возможных областей применения Tfs-эфиров является создание на их основе ряда водорастворимых реагентов для химической модификации белков. В качестве примера в табл. 1 приведен Tfs-эфир *d*-биотина. Кроме того, к настоящему времени нами получен ряд других Tfs-эфиров *N*-защищенных аминокислот, свойства и применение которых будут описаны в отдельных публикациях.

Проведение химического синтеза пептидов в чисто водной среде с использованием Tfs-эфиров возможно, но не всегда целесообразно. Несмотря на высокую гидрофильность, не все Tfs-эфиры одинаково хорошо растворимы в воде (как и любые другие "водорастворимые" эфиры). Для проведения реакции активированное производное аминокислоты лучше добавлять в виде раствора в органическом растворителе. Это позволяет исключить частичный гидролиз активированного эфира до начала реакции. В наших экспериментах активированные эфиры использовались, как правило, в виде раствора в DMF или метаноле и добавлялись к раствору нуклеофила в воде или в смеси DMF-вода (в зависимости от растворимости нуклеофила).

Синтез дипептидов является хорошей моделью для изучения водорастворимых эфиров, так как аминокислоты, используемые в качестве нуклеофилов, плохо растворимы в органических растворителях. В качестве нуклеофила был выбран аланин, а также пролин, для которого плохая реакционная способность в водной среде известна из литературы [5]. Выбор Tfs-эфиров конкретных производных аминокислот обусловлен прежде всего различием в их растворимости. Гидрофильность Tfs-эфиров высока, но все же ее недостаточно,

Таблица 1. Свойства некоторых Tfs-эфиров

Активированный эфир	Выход, %	R_f	$[\alpha]_D^{20}$ (с 1, метанол)	m/z^*
Boc-Ala-OTfs	86	0.18(1)	-24	416
Fmoc-Lys(Boc)-OTfs	90	0.31(1)	-13	695
<i>d</i> -Biotin-OTfs	82	0.1(1)	+23	471

* Масса отрицательно заряженного иона.

чтобы обеспечить хорошую растворимость в воде ряда Fmoc-защищенных аминокислот. Fmoc-Lys(Boc)-OTfs является одним из таких плохо растворимых в воде соединений. Однако даже для него удается подобрать условия, когда взаимодействующие компоненты находятся в гомогенной фазе. Это оказалось практически недостижимым при использовании в данной реакции гидрофобных Pfr-эфиров. Реакцию приходится вести в гетерофазной среде, и это отражается как на выходе целевого пептида, так и на времени реакции. Свойства пептидов, синтезированных с использованием Tfs-эфиров, приведены в табл. 2.

Существенное место при изучении Tfs-эфиров уделено нами сравнительным кинетическим исследованиям с целью получения информации по двум интересующим нас вопросам. Первый касается относительной эффективности новых активированных эфиров, а именно: насколько различаются скорости образования пептидной связи и гидролиза активированного эфира? Второй вопрос связан с выяснением разницы в скоростях одной и той же реакции, осуществленной в воде и DMF. Поэтому кинетические исследования проводились в двух направлениях. Сначала мы сравнили Tfs-эфиры по их реакционной способности и соотношению скорости аминоллиза к скорости гидролиза с использованными нами ранее 2-нитро-4-сульфофениловыми (Nsp) эфирами [11]. Эту группу экспериментов проводили в водных буферных растворах с использованием УФ-спектрометрии для контроля за протеканием реакции по изменению поглощения фенолят-ионов. Для сравнения Boc-Ala-OTfs и Boc-Ala-ONsp их реакция с лейцинамидом проводилась в условиях большого избытка нуклеофила, что соответствует механизму реакции псевдопервого порядка, и по скорости протекания реакции можно судить, в

первом приближении, о сравнительной эффективности двух гидрофильных эфиров. Экспериментально можно измерить либо только константу скорости гидролиза, либо суммарную константу для реакции гидролиза и аминоллиза. Константу аминоллиза получали из их разницы, как это сделано для Nsp-эфиров [11].

Из табл. 3 видно, что Tfs-эфиры не только значительно более реакционноспособны, чем Nsp-эфиры, но и имеют лучшее соотношение константы скорости аминоллиза K_n к константе гидролиза K_h в диапазоне pH 6 - 7. К сожалению, напрямую сравнить Tfs-эфиры с 3-сульфооксисукцинимидными эфирами не удастся, поскольку в литературе приведены данные для другой модельной реакции и для корректного сравнения необходимы дополнительные эксперименты. Тем не менее, сравнивая наши данные с данными, опубликованными в [7], можно в первом приближении сказать, что Tfs-эфиры более реакционноспособны.

Вторая группа кинетических экспериментов проведена с использованием флуоресцентной спектроскопии. В этих экспериментах мы пренебрегали небольшим гидролизом активированного эфира, а для поддержания pH в ходе реакции использовали триэтиламин. Цель этих экспериментов – установить соотношения скоростей аминоллиза в органической и водной средах. В наших предыдущих кинетических исследованиях [11] мы применили метод флуоресценции, который позволяет проводить измерения в широком диапазоне концентраций как в воде, так и в большинстве органических растворителей, включая DMF. Поэтому было решено использовать метод флуоресценции для изучения свойств Tfs-эфиров. К сожалению, Tfs-эфиры значительно уступают по величине изменения флуоресценции в ходе реакции

Таблица 2. Свойства пептидов, синтезированных с помощью Tfs-эфиров

Пептид	Выход, %	Т. пл., °С	R_f	$[\alpha]_D^{20}$ (с 1, метанол)
Boc-Ala-Ala-OH	92	97 - 98	0.58(1)	-33.0
Boc-Ala-Ala-Ala-OH	78	197 - 202	0.44(1)	-43.0
Fmoc-Lys(Boc)-Ala-OH	84	108 - 110	0.31(2)	-11.7
Fmoc-Lys(Boc)-Pro-OH	88	Масло	0.38(2)	-30.7

Таблица 3. Сравнение констант скорости аминоллиза (k_n) и гидролиза (k_h) двух гидрофильных активированных эфиров, Boc-Ala-OTfs и Boc-Ala-ONsp, при их реакции с лейцинамидом в 0.1 М натрий-фосфатном буфере при 20°C

pH	Boc-Ala-OTfs			Boc-Ala-ONsp		
	k_n , мин ⁻¹	k_h , мин ⁻¹	k_n/k_h	k_n , мин ⁻¹	k_h , мин ⁻¹	k_n/k_h
6.0	0.201	0.052	3.9	0.0066	0.0049	1.3
7.0	1.780	0.073	24.5	0.206	0.0117	18.6

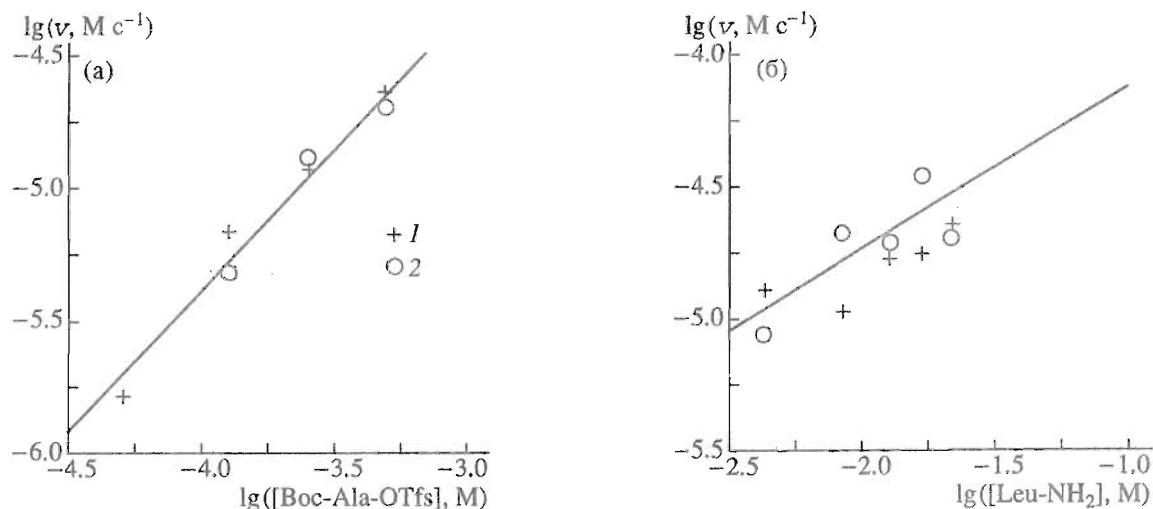


Рис. 1. Зависимость скорости реакции Boc-Ala-OTfs с лейцинамидом от начальной концентрации реагентов (в логарифмических координатах). а – $[Leu-NH_2]_0$ 20 мМ, б – $[Boc-Ala-OTfs]_0$ 0.5 М. Реакцию проводили при 20°C с гидрохлоридом лейцинамида в присутствии двукратного избытка триэтиламина (1) или с лейцинамидом в виде свободного основания (2).

другим изученным нами фторароматическим эфирам [11], поэтому измеренные нами величины определены с довольно большой погрешностью. Тем не менее полученные результаты позволяют сделать определенные выводы.

Изучение кинетики любой химической реакции должно начинаться с определения порядка реакции по каждому компоненту [12]. Для этого измеряют зависимость начальной скорости реакции от концентрации сначала по одному компоненту, а затем по другому. Выразив результаты эксперимента так, как это представлено на рис. 1, из наклона прямой определяют порядок реакции. Знание порядка реакции дает размерность константы скорости реакции.

В нашей первой работе по кинетике образования пептидной связи [11] в качестве нуклеофила использовали лейцинамид и метиловый эфир валина. В данной серии экспериментов мы ограничились использованием лейцинамида.

Оказалось, что реакция Boc-Ala-OTfs с лейцинамидом описывается формулой

$$v = kAE^1N^{0.5} \quad (1)$$

(AE – концентрация активированного эфира, N – концентрация лейцинамида), т.е. реакция не подчиняется механизму второго порядка. Интересно, что такое уравнение справедливо не только для реакции в безводной среде, где она может быть изучена в чистом виде, но и в водно-органической и в чисто водной среде. Действительно, кинетические данные при любых соотношениях реагентов хорошо описывались формулой (1), что видно из рис. 2. Величину константы скорости реакции оценивали с помощью подгонки теоретической кривой, рассчитанной согласно уравнению (1), к экс-

периментальных данным путем варьирования k . Дополнительной проверкой правильности определения порядка реакции служила независимость определенной таким методом константы

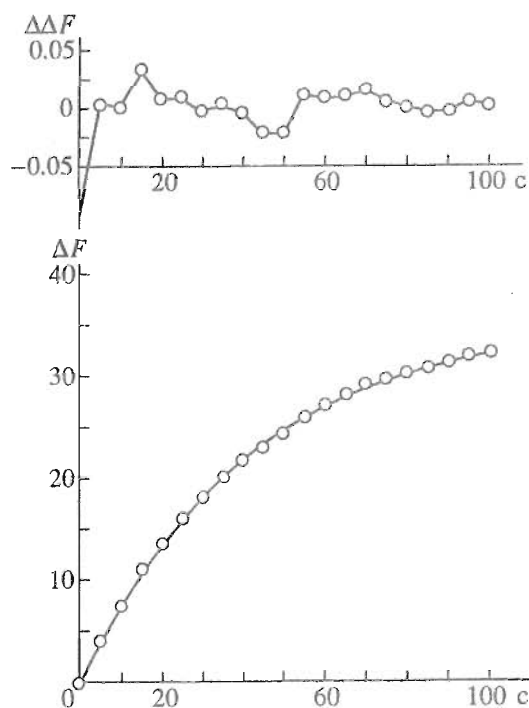


Рис. 2. Кинетика реакции 0.5 мМ Boc-Ala-OTfs с 20 мМ лейцинамидом (свободное основание) в DMF при 20°C. Точки – изменение интенсивности флуоресценции при 375 нм; кривая рассчитана согласно уравнению (1) и подогнана к экспериментальным данным путем варьирования константы скорости реакции. Вверху – распределение разностей между экспериментальными и теоретическими величинами ($\Delta\Delta F = \Delta F_{\text{экс}} - \Delta F_{\text{теор}}$).

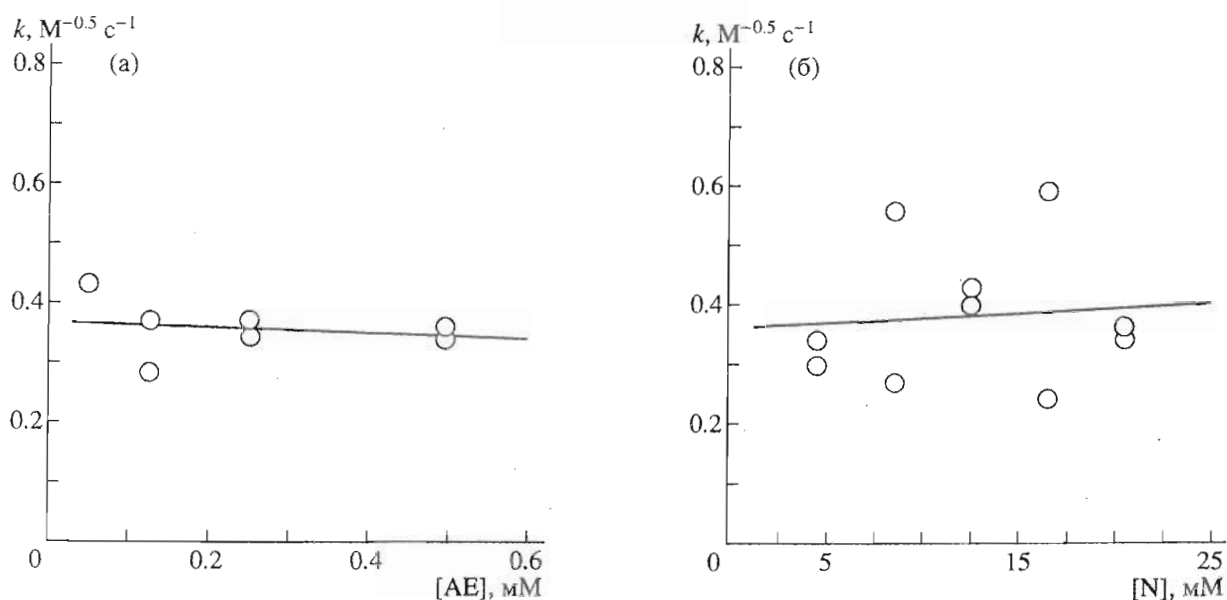


Рис. 3. Константа скорости реакции Вос-Ala-OTfs (AE) с лейцинамидом (N) в зависимости от изменения концентрации одного реагента при постоянной концентрации другого. Условия проведения реакции те же, что и на рис. 1.

от концентрации реагентов (рис. 3). Сравнив на этом рисунке серии экспериментов (рис. 3а, 3б), можно видеть, что, несмотря на довольно существенный разброс, константа имеет одно и то же среднее значение, что невозможно получить, если описывать реакцию по механизму второго порядка (см. [11]).

При добавлении воды в реакционную смесь эффективная константа скорости реакции, отра-

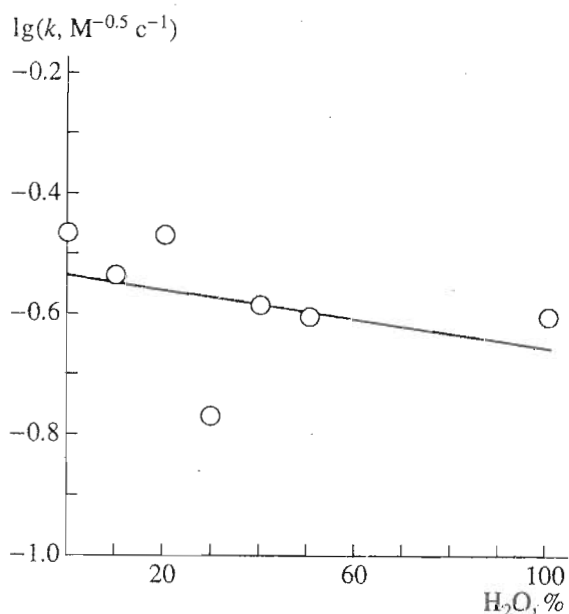


Рис. 4. Изменение эффективной константы скорости реакции Вос-Ala-OTfs с лейцинамидом в зависимости от содержания воды в реакционной среде.

жающая суммарную реакцию аминолита и гидролиза, немного уменьшается. На рис. 4 приведена зависимость константы скорости реакции Вос-Ala-OTfs с лейцинамидом от содержания воды в смеси DMF-вода. Хорошо видна тенденция к снижению константы скорости реакции с ростом содержания воды в смеси, хотя это снижение и невелико.

Напрямую сравнить реакционную способность Tfs-эфиров с Pfr-эфирами можно, только сравнивая начальные скорости реакций при прочих равных условиях, потому что Вос-Ala-OPfr, Вос-Ala-OTfr и ряд других гидрофобных фторароматических эфиров в реакции с лейцинамидом отвечают иному уравнению скорости [11]:

$$v = kAE^{1.5}N^{0.5}, \quad (2)$$

т.е. реакция гораздо сильнее зависит от концентрации активированного эфира (AE) и константа имеет иную размерность (интересно, что в данном случае эта размерность не отличается от таковой для реакции второго порядка). В табл. 4 представлены результаты, полученные для Tfs-эфиров в сравнении с ранее опубликованными данными для других фторароматических эфиров [11].

Хотя полученных результатов недостаточно для установления истинного механизма реакции, дискуссия на эту тему нам представляется полезной. Полуцелые порядки реакции характерны для цепных реакций с квадратичным обрывом цепи [12]. Постулируя такой механизм, мы предложили описание ряда последовательных стадий для Pfr-эфиров и их ближайших аналогов [11].

В случае Tfs-эфиров мы также постулируем подобный механизм реакции.

Таким образом, Tfs-эфиры обладают набором ценных свойств, что позволяет надеяться на их разнообразное применение как в прикладном плане, так и для установления фундаментальных закономерностей образования пептидной связи в воде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные аминокислот (Reanal, Венгрия), DCC (Fluka, Швейцария). *n*-Сульфотетрафторфенол (ГНЦ "Прикладная химия", Пермь) дополнительно очищали, как описано выше. Кинетические измерения с помощью УФ-спектрофотометрии проводили, используя спектрофотометр СФ-26, оснащенный компенсационным самописцем TZ 4620 (Laborní Prístroje, Чехо-Словакия), присоединенным параллельно цифровому вольтметру прибора.

Флуоресценцию активированных эфиров измеряли при 20°C с помощью спектрофлуориметра лабораторного изготовления, основные конструкционные особенности которого были описаны ранее [13]. Флуоресценцию возбуждали светом линий ртути при 280.4 и 296.7 нм. Свет флуоресценции собирали с передней поверхности стандартной кварцевой кюветы. Для изучения кинетики реакции синтеза пептидов измеряли уменьшение интенсивности флуоресценции при 375 нм как функцию времени. Как правило, проводили две серии экспериментов – с лейцинамидом в виде свободного основания и с гидрохлоридом лейцинамида в присутствии двукратного избытка триэтиламина. Тем самым учитывали возможное влияние триэтиламина на механизм реакции.

Для оценки константы скорости реакции экспериментальные кинетические данные подгоняли теоретической кривой, рассчитанной согласно принятой кинетической схеме, путем варьирования величины константы скорости. При этом использовали метод нелинейной регрессии [14]. Для численного решения дифференциальных сравнений, соответствующих принятой кинетической схеме, использовали метод Рунге–Кутты 4 - 5-го порядка [15].

Для препаративной колоночной хроматографии Tfs-эфиров использовали сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция), пептиды хроматографировали на силикагеле Si 60 (Merck, Германия). Для ТСХ использовали пластины силикагеля (кат. № 5554; Merck, ФРГ) и следующие системы растворителей: хлороформ–метанол–уксусная кислота, 20 : 4 : 1 (1) и 95 : 4 : 1 (2).

Типовая методика приведения кинетических экспериментов (УФ-детектирование). К 2 мл 0.1 М фосфатного буфера (гидролиз) или 40 мМ

Таблица 4. Константы скорости и начальные скорости реакции* активированных эфиров с лейцинамидом в DMF

Активированный эфир	k^{**} , $M^{-1} c^{-1}$	$v \times 10^5$, $mol c^{-1}$
Woc-Ala-OTfs	$0.4 \pm 0.1^{***}$	1.26
Woc-Ala-OTfc	40 ± 8	4.0
Woc-Ala-OPfp	25 ± 7	2.5
Woc-Ala-OTfp	19 ± 4	1.9
Woc-Ala-OTrf	0.8 ± 0.2	0.8

* Начальные скорости реакции приведены для 1 мМ концентрации активированного эфира и лейцинамида.

** Использованы данные из работы [11], для Tfs-эфира – данные настоящей работы.

*** $M^{-0.5} c^{-1}$.

лейцинамида в указанном буфере добавляли 10 мкл 0.1 М раствора активированного эфира в метаноле (аминолиз и гидролиз) и регистрировали изменение поглощения фенолят-иона при λ 390 нм для Nsp-эфира и λ 245 нм для Tfs-эфира.

Типовая методика получения Tfs-эфиров аминокислот. К раствору 10 ммоль (2.68 г) *n*-сульфотетрафторфенолята натрия в 20 мл DMF добавляли 10 ммоль производного аминокислоты и охлаждали до 0°C. К охлажденному раствору добавляли небольшими порциями 11 ммоль (2.3 г, 10% избыток) DCC. Реакцию продолжали 1 ч, отфильтровывали выпавший осадок дидиклогексилмочевины и упаривали досуха на ротационном испарителе в вакууме масляного насоса при температуре, не превышающей 30°C. Остаток в колбе промывали эфиром, растворяли в 30 - 50 мл метанола и хроматографировали на колонке (2.5 × 40 см) с сефадексом LH-20. Фракции, соответствующие активированному эфиру и гомогенные по ТСХ, объединяли, упаривали, промывали эфиром и после высушивания в вакуумном эксикаторе использовали без дополнительной очистки.

Типовая методика получения дипептидов. Раствор 5 ммоль Tfs-эфира производного аминокислоты в 10 мл DMF небольшими порциями добавляли при перемешивании к 25 мл охлажденного до 5°C 1 М водного раствора аминокислоты, поддержания pH в интервале 7 - 8 с помощью насыщенного раствора $NaHCO_3$. После перемешивания в течение 1 ч реакционную смесь подкисляли 10% $NaHSO_4$ до pH 3 - 4, не допуская сильного вспенивания, и полученную суспензию трижды экстрагировали этилацетатом. Объединенные этилацетатные вытяжки сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали. Окончательную очистку проводили на колонке (2.5 × 30 см) с силикагелем в хлороформе, используя возрастающий градиент (1 - 5%) метанола.

Woc-Ala-Ala-Ala-OH. Раствор 0.44 г (1 ммоль) Woc-Ala-OTfs в 2 мл DMF небольшими порциями

прибавляли к раствору 0.19 г (1 ммоль) HCl · H-Ala-Ala-OH в смеси 3 мл DMF и 5 мл воды, поддерживая температуру и pH, как это указано в методике для синтеза дипептидов. Реакцию проводили в течение 1 ч. Обработку реакционной смеси и очистку проводили так же, как это описано для дипептидов.

Авторы благодарны Д. Шабановицу за измерение масс-спектров и проф. Р. Кретсингеру за ценные замечания при написании этой статьи. Данная работа получила частичную финансовую поддержку от фонда Council of Tobacco Research (США), Российского фонда фундаментальных исследований и Международного фонда научных исследований ISF.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anjaneyulu P.S.R., Staros J.V. // Int. J. Pept. Protein Res. 1987. V. 30. P. 117 - 124.
2. Hirschmann R., Veber D. // The Chemistry of Polypeptides / Ed. Katsoyannis P.G. London, New York: Plenum Press, 1973. P. 144 - 165.
3. Offord R.E. Semisynthetic Proteins. Chichester, New York: John Wiley & Sons Ltd., 1980.
4. Kisfaludy L., Roberts J.E., Johnson R.H., Mayers G.L., Kovacs J. // J. Org. Chem. 1970. V. 35. P. 3563 - 3565.
5. Гершкович А.А., Серебрянный С.Б. // Биоорганическая химия. 1979. Т. 5. С. 1125 - 1132.
6. Медведкин В.Н., Митин Ю.В., Пермяков Е.А. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. С. 1019 - 1022.
7. Staros J.V. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 3950 - 3955.
8. Atherton E., Sheppard R.S. // Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach / Eds Rickwood D., Hames B.D. Oxford: IPL Press, 1989. P. 32 - 33.
9. Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl). Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1974. B. XV/2. S. 113.
10. Органикум. Практикум по органической химии / Ред. Шветлик К. Пер. с нем. М.: Мир, 1979. С. 402 - 410.
11. Permyakov E.A., Medvedkin V.N., Klimenko L.V., Mitin Y.V., Permyakov S.E. // Int. J. Pept. Protein Res. 1994. V. 44. P. 472 - 476.
12. Эмануэль Н.М., Кнорре Д.Г. Химическая кинетика. М.: Высш. школа, 1969.
13. Permyakov E.A., Burstein E.A., Sawada Y., Yamasaki Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 491. P. 149 - 154.
14. Reich J.G., Wangerman G., Falk M., Rhode K. // Eur. J. Biochem. 1972. V. 26. P. 368 - 379.
15. Форсайт Д., Малькольм М., Моулер К. Машинные методы математических вычислений: Пер. с англ. М.: Мир, 1980.

p-Sulfotetrafluorophenyl Hydrophilic Active Esters of Amino Acids in Peptide Synthesis

V. N. Medvedkin*,¹ V. F. Zabolotskikh**, E. A. Permyakov***, Yu. V. Mitin*, M. N. Sorokina**, and L. V. Klimenko*

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast', 142292 Russia

**State Research Center for Applied Chemistry, Perm' Branch, Perm', Russia

***Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast', 142292 Russia

Abstract – Highly reactive hydrophilic (i.e., water-soluble) *p*-sulfotetrafluorophenyl esters (Tfs esters) are proposed for peptide synthesis in aqueous and aqueous-organic media, as well as for protein and peptide partial synthesis in an aqueous medium. These esters can serve as a basis for creating a series of protein modifying reagents. As they are analogs of the widely used pentafluorophenyl esters, the Tfs esters possess a high reactivity coupled with good stability during storage. The expression for the reaction rate (for substrates AA₁ and AA₂) is shown to be $v = k[\text{Boc-AA}_1\text{-OTfs}][\text{H-AA}_2\text{-NH}_2]^{0.5}$ for both water and DMF, i.e., the reaction is not a simple second-order reaction. The reaction rate in water is only slightly lower than that in DMF.

Key words: peptide synthesis; hydrophilic active esters; *p*-sulfotetrafluorophenyl esters, reaction kinetics and order.

¹ To whom correspondence should be addressed.