



УДК 577.466.55

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ. ВЛИЯНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА РАСТВОРИМОСТЬ АМИНОКИСЛОТ В АПРОТОННЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

© 1998 г. М. Г. Ряднов, Н. Я. Кашпарова, И. А. Кашпаров, Ю. В. Митин[#]

Институт белка РАН, 142292, Пушкино Московской обл.

Поступила в редакцию 10.09.97 г. Принята к печати 05.12.98 г.

Для повышения растворимости свободных аминокислот с целью использования их в пептидном синтезе предложена система, состоящая из диметилформамида, неорганической добавки и пиридина. В качестве добавки служат такие соединения, как BF_3 , AlCl_3 , SnCl_2 , SiCl_4 , ZnCl_2 , SbCl_3 , CaCl_2 , BaI_2 , CdI_2 , NaI . Аминокислоты в таком растворе (рН 5.2–5.3) были использованы в синтезе N^α -защищенных ди- и трипептидов путем ацилирования их пентафторфениловыми эфирами соответствующих N^α -защищенных аминокислот или пептидов с выходом более 90%.

Ключевые слова: аминокислоты; пептиды; апротонные растворители; кислоты Льюиса.

Крайне низкая растворимость природных α -аминокислот в апротонных растворителях, даже таких, как диметилформамид, диметилсульфоксид и гексаметилтриамид фосфорной кислоты, затрудняет введение их в различные реакции. Недавно мы показали, что система растворителей, состоящая из диметилформамида, сильной кислоты (CF_3COOH , TosOH , HBF_4 и т.д.) и избытка основания с $\text{pK} \leq 6$ (пиридин, диметиланилин и т.д.), эффективна для растворения аминокислот [1]. В такой системе растворителей удобно проводить реакции ацилирования аминогрупп и синтезировать производные аминокислот (Boc , Z , Fmoc), а также дипептиды с высоким выходом.

Продолжая наши исследования, мы нашли, что вместо сильных протонных кислот удобно использовать кислоты Льюиса, такие, как BF_3 , SbCl_3 , SiCl_4 и т.д. Они легко растворяются, например, в диметилформамиде, образуя систему, в которой, в свою очередь, легко растворяются аминокислоты (табл. 1). Важно отметить, что в то время как BF_3 или его эфират, а также SiCl_4 и SbCl_3 являются агрессивными соединениями, очень чувствительными к влаге, их комплексы с пиридином ($\text{BF}_3 \cdot \text{Py}$, $\text{SiCl}_4 \cdot \text{Py}$ и $\text{SbCl}_3 \cdot \text{Py}$) представляют собой устойчивые, кристаллические, негигроскопичные соединения, с которыми удоб-

но работать. Растворы этих комплексов в диметилформамиде являются хорошими растворителями для аминокислот. Кроме указанных кислот Льюиса можно также использовать AlCl_3 , ZnCl_2 , SnCl_2 . Более того, вместо типичных кислот Льюиса для создания смеси, растворяющей аминокислоты, подходят некоторые соли металлов, которые трудно причислить к кислотам Льюиса. Достаточно эффективными для этой цели оказались CaCl_2 , BaI_2 , CdI_2 и NaI . Неорганические добавки увеличивают растворимость аминокислот в диметилформамиде на один-два порядка (табл. 1).

Полученные таким образом растворы аминокислот можно непосредственно вводить в реакцию ацилирования. В качестве ацилирующих агентов мы использовали пентафторфениловые эфиры аминокислот (табл. 2). Для этих целей подходят также другие активированные соединения, обычно применяемые в пептидном синтезе: смешанные ангидриды, карбодиимиды с добавками, урониевые соли и т.д. (результаты не приведены). Добавление одного-двух эквивалентов пиридина в полученные растворы аминокислот заметно ускоряет реакцию ацилирования (рисунок, а).

Мы не заметили принципиальной разницы между перечисленными выше неорганическими добавками при их использовании для растворения аминокислот и последующего синтеза пептидов. Можно только отметить, что с AlCl_3 и NaI выход пептидов был несколько ниже, чем в других случаях. Мы можем особенно рекомендовать для этих целей BF_3 , ZnCl_2 и CaCl_2 .

Сокращения: Py – пиридин, OPfr – пентафторфенилокси, Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; Mbh – 4,4'-диметоксибензгидрил.

[#] Автор для переписки (тел./факс: 924-04-93; e-mail: protres@ipr.serpukhov.su).

Для завершения реакции обычно достаточно 2–3 ч, однако в случае пространственно затрудненных аминокислот требуется времени в несколько раз больше. Так, при синтезе дипептида Z-Ala-Phe-OH из Z-Ala-OPfp и фенилаланина реакция заканчивается через 2 ч, в то время как для получения дипептида Z-Val-Ile-OH из Z-Val-OPfp и изолейцина потребовалось 13 ч (табл. 2, рисунок, а, б).

Следует отметить, что кроме диметилформаида в качестве апротонного растворителя можно использовать также диметилсульфоксид, гексаметилтриамид фосфорной кислоты и тетраметилмочевину.

Таким образом, суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что для растворения аминокислот эффективна система, состоящая из диметилформаида, неорганической добавки и пиридина. В качестве добавки могут служить BF₃, AlCl₃, SnCl₂, SiCl₄, ZnCl₂, SbCl₃, CaCl₂, BaI₂, CdI₂, NaI. Аминокислоты, растворенные в такой системе, вступают в реакцию с различными ацилирующими агентами, образуя пептиды или производные аминокислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуры плавления определяли на приборе фирмы Voetius (Германия) (не исправляли). Состав реакционных смесей и индивидуальность полученных соединений контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol UV 254 (Чехия) и Merck F 254 (Германия) в следующих системах растворителей: хлороформ–метанол–уксусная кислота (95:5:1) и бензол–диоксан–уксусная кислота (90:25:4). Визуализацию проводили в УФ-свете при 254 нм и окрашиванием 0.2% раствором нингидрина в этиловом спирте, а также толидиновым реактивом после хлорирования. Препаративную хроматографию осуществляли на силикагеле L 40/100 Chemapol (Чехия). В работе использовали аминокислоты и их производные фирм Reanal (Венгрия) и Fluka (Швейцария). ВЭЖХ проводилась на хроматографе фирмы LKB (Швеция). Все безводные неорганические добавки – отечественного производства. Все растворители перед использованием перегоняли в вакууме и хранили над молекулярными ситами 4 Å.

Определение растворимости аминокислот. Смесь 1 ммоль аминокислоты и 1 мл 1 М раствора неорганической добавки с пиридином (1:1) в диметилформаиде нагревали до 70°C, затем перемешивали 2 ч при комнатной температуре, нерастворившуюся часть отфильтровывали, промывали диметилформаидом и эфиром, сушили и взвешивали. Разность между взятой навеской и нерастворившимся остатком дает возможность

Таблица 1. Растворимость аминокислот (моль/л) и их производных в 1 М растворе X – пиридин (1 : 1) в DMF

Аминокислота	X				
	ZnCl ₂	CaCl ₂	BF ₃	NaI	–
Ala	0.49	0.36	0.45	0.47	0.023
Arg	0.82	0.65	0.92	0.50	0.019
Asn	0.42	0.39	0.55	0.35	0.012
Asp	0.32	0.14	0.30	0.22	0.001
Gln	0.33	0.17	0.42	0.35	0.009
Glu	0.26	0.10	0.25	0.20	0.003
Gly	0.50	0.27	0.50	0.36	0.022
His	0.28	0.12	0.40	0.12	0.005
Ile	0.43	0.40	0.65	0.36	0.021
Leu	0.60	0.40	0.57	0.50	0.028
Lys	0.20	0.15	0.15	0.12	0.002
Met	0.40	0.36	0.60	0.30	0.015
Phe	0.69	0.42	0.72	0.55	0.022
Pro	0.90	0.64	0.94	0.82	0.040
Ser	0.38	0.25	0.35	0.25	0.007
Thr	0.30	0.22	0.35	0.26	0.010
Trp	0.96	0.89	>1	>1	0.041
Tyr	0.22	0.10	0.30	0.10	0.005
Val	0.33	0.30	0.52	0.30	0.010
Arg(NO ₂)	0.50	0.45	0.60	0.40	0.027
Asn(Mbh)	0.69	0.55	0.70	0.60	0.024
Asp(OBu ^l)	0.39	0.40	0.49	0.41	0.005
Cys(Bzl)	0.56	0.60	0.70	0.70	0.008
Gln(Mbh)	0.77	0.63	0.81	0.77	0.020
Glu(OBzl)	0.56	0.47	0.64	0.56	0.012
His(Bzl)	0.45	0.31	0.53	0.31	0.016
Lys(Boc)	0.34	0.30	0.32	0.27	0.007
Ser(Bzl)	0.60	0.40	0.67	0.45	0.010
Thr(Bu ^l)	0.77	0.50	0.90	0.65	0.026
Tyr(Bzl)	0.40	0.25	0.40	0.30	0.014

определить растворимость, выражая ее в мг/мл и далее пересчитывая в моль/л (табл. 1).

Типовая методика получения комплексов BF₃ · Py, SiCl₄ · Py, SbCl₃ · Py. К раствору 200 ммоль галогенида в 200 мл эфира при охлаждении до 0°C и перемешивании добавляли по каплям раствор 16.5 мл (207 ммоль) пиридина в 150 мл эфира. Осадок быстро отфильтровывали и промывали эфиром, затем сушили в эксикаторе над КОН и в сушильном шкафу над H₂SO₄. Выходы полученных соединений составили порядка 80–85%. Температуры плавления для BF₃ · Py – 175–195°C, SbCl₃ · Py – 147–155°C, SiCl₄ · Py разлагается выше 260°C.

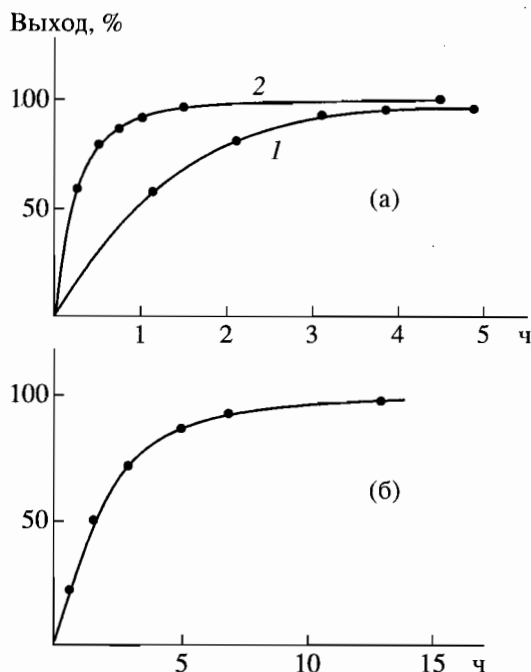
Таблица 2. Пептиды, синтезированные в системе 1 М X – пиридин (1 : 1) в DMF

Ацилирующий агент*	Аминокислота	X	Время, ч	Продукт реакции	Выход, %	Т.пл., °C (лит. данные)
Z-Ala	Phe	SbCl ₃ ^{2*}	2	Z-Ala-Phe-OH	92	125–127 (124–126 [2])
Z-Ala	Phe	BaI ₂	4	Z-Ala-Phe-OH	84 ^{4*} , 82 ^{5*}	125–127 (124–126 [2])
Boc-Ala	Trp	CdI ₂	3	Boc-Ala-Trp-OH	83	177–180
Z-Val	Phe	ZnCl ₂	10	Z-Val-Phe-OH	93	175–177 (176–178 [3])
Z-Phe	Ile	ZnCl ₂	10	Z-Phe-Ile-OH	87	122–123 (122–124 [4])
Z-Phe	Ile	CaCl ₂	10	Z-Phe-Ile-OH	83 ^{5*}	122–123 (122–124 [4])
Boc-Phe	Leu	SnCl ₂	4	Boc-Phe-Leu-OH	93	139–141 (138–140 [5])
Z-Gly	Phe	NaI	3	Z-Gly-Phe-OH	75	126–127 (127–128 [6])
Z-Ile	Phe	SiCl ₄ ^{2*}	13	Z-Ile-Phe-OH	95	177–179 (177–179 [7])
Z-Val	Ile	CaCl ₂	13	Z-Val-Ile-OH	92	136–138 (136–138 [8])
Z-Val	Ile	SnCl ₂	13	Z-Val-Ile-OH	90 ^{4*}	136–138 (136–138 [8])
Boc-Tyr(Bzl)	Gly	BF ₃ ^{2*}	6	Boc-Tyr(Bzl)-Gly-OH	95	151–152 (151–152 [9])
Boc-Tyr(Bzl)-Gly	Gly	BF ₃ ^{2*}	13	Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OH	89	149–152
Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly	Phe	BF ₃ ^{2*}	13	Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-OH ^{3*}	96	94–95 (95–96 [10])
Z-Tyr(Bzl)	Gly	AlCl ₃	6	Z-Tyr(Bzl)-Gly-OH	63	160–163.5 (163.5 [11])
Z-Tyr(Bzl)	Gly	CdI ₂	6	Z-Tyr(Bzl)-Gly-OH	82 ^{5*}	160–163.5 (163.5 [11])
Z-Phe	Gly	BaI ₂	2	Z-Phe-Gly-OH	92	151–152 (150–154 [7])
Z-Phe	Leu	SnCl ₂	3	Z-Phe-Leu-OH	93	140–142 (141–142 [12])
Z-Phe	Leu	ZnCl ₂	4	Z-Phe-Leu-OH	91 ^{5*}	140–142 (141–142 [12])
Z-Pro	Val	BF ₃ ^{2*}	13	Z-Pro-Val-OH	75	135–137 (134–136 [13])
Z-Gly	Glu(OBzl)	CaCl ₂	10	Z-Gly-Glu(OBzl)-OH ^{3*}	89	95–97 (95–96.6 [14])
Z-Gly	Glu(OBzl)	NaI	10	Z-Gly-Glu(OBzl)-OH ^{3*}	80 ^{5*}	95–97 (95–96.6 [14])
Boc-Phe	Phe	SbCl ₃ ^{2*}	6	Boc-Phe-Phe-OH	84	144–146 (145–146 [15])
Boc-Tyr(Bzl)	Ile	SbCl ₃	13	Z-Tyr(Bzl)-Ile-OH ^{3*}	84	161–163
Boc-Glu(OBzl)	Phe	SbCl ₃	6	Boc-Glu(OBzl)-Phe-OH	90	112–114
Z-Asp(OBzl)	Lys(ZCl)	CdI ₂	13	Z-Asp(OBzl)-Lys(ZCl)-OH ^{3*}	92	101–102

* В виде Pfr-эфира; ^{2*} использовали в виде комплекса X · Py без дополнительного добавления пиридина; ^{3*} очищали с помощью колоночной хроматографии (см. "Экспер. часть"); ^{4*} вместо DMF использовали DMSO; ^{5*} вместо DMF использовали гексаметилтриамид фосфорной кислоты.

Типовая методика синтеза пептидов в системе апротонный растворитель–неорганическая добавка–пиридин. 2 ммоль аминокислоты растворяли в 4 мл 1 М раствора неорганической добавки и пиридина (1:1) в апротонном растворителе (DMF, DMSO, гексаметилтриамид фосфорной кислоты, тетраметилмочевина) при комнатной температуре или при нагревании до 70°C с последующим охлаждением до комнатной температуры, добавляли 1 ммоль пентафторфенилового эфира Z- или Boc-N-защитенной аминокислоты или пептида и дополнительно 2 ммоль пиридина (в отдельных опытах пиридин не добавляли, табл. 2), раствор

выдерживали 2–13 ч. Затем в реакционную смесь добавляли либо 5% HCl для Z-производных, либо 10% раствор лимонной кислоты для Boc-производных и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой, этилацетат с добавлением ацетонитрила для азеотропной сушки упаривали в вакууме. Полученный пептид кристаллизовали из этилацетата с гексаном (табл. 2) либо очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле L 40/100 Chemapol (Чехия) в системе растворителей хлороформ–метанол–уксусная кислота (95:5:1).



Кинетика реакций (см. "Экспер. часть"): (а) – Z-Ala-OPfp + Phe → Z-Ala-Phe-OH без пиридина (1), с добавлением 2 ммоль пиридина (2); (б) – Z-Val-OPfp + Phe → Z-Val-Phe-OH с добавлением 2 ммоль пиридина.

Определение кинетики реакций Z-Ala-OPfp с фенилаланином и Z-Val-OPfp с изолейцином. Ход реакций анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Колонка SGX C18 Serapop, 5 мкм, 3 × 150 мм, подвижная фаза – градиент ацетонитрила в воде от 15 до 100% с содержанием 0.1% TFA, скорость элюции 1 мл/мин.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-03-33169а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mitin Yu.V. // Int. J. Pept. Protein Res. 1996. V. 48. P. 374–376.
2. Barton M.A., Lemieux R.U., Savoie J.Y. // J. Am. Chem. Soc. 1973. V. 95. P. 4501–4506.
3. Nicolaidis E., DeWald H., Westland R., Lipnik M., Poster J. // J. Med. Chem. 1968. V. 11. P. 74–77.
4. Miyoshi M. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1973. V. 46. P. 1489–1496.
5. Bower J.D., Guest K.P., Morgan B.A. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1976. V. 1. P. 2488–2492.
6. Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M. // J. Am. Chem. Soc. 1964. V. 86. P. 1839–1843.
7. Itoh M. // Chem. Pharm. Bull. 1972. V. 20. P. 664–667.
8. Hardy P.M., Samworth D.J. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1977. V. 1. P. 1954–1960.
9. Flouret G.R., Arnold W.H., Cole J.W., Morgan R.L., White W.F., Hedlund M.T., Rippel R.H. // J. Med. Chem. 1973. V. 16. P. 369–373.
10. Pietrzik E., Kalbacher H., Voelter W. // Justus Liebigs Ann. Chem. 1977. P. 609–613.
11. Wunsch E., Fries G., Zwick A. // Chem. Ber. 1958. V. 91. P. 542–547.
12. Pravda Z., Poduska K., Blaha K. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1964. V. 29. P. 2626–2630.
13. Schröder E., Gibian H. // Ann. Chem. 1961. V. 649. P. 168–182.
14. Kienhuis H., Vandelinde A., van der Holst J.P., Verweij A. // Rec. Trav. Chim. 1961. V. 80. P. 1278.
15. Chang J.K., Shimizu M., Wang S.-S. // J. Org. Chem. 1976. V. 41. P. 3255–3258.

Synthesis of Peptides Using Free Amino Acids. The Effect of Inorganic Compounds on the Solubility of Amino Acids in Aprotic Solvents

M. G. Ryadnov, N. Ya. Kashparova, I. A. Kashparov, and Yu. V. Mitin[#]

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

In order to increase the solubility of free amino acids so that they could be used in peptide synthesis, a system consisting of dimethylformamide, an inorganic additive, and pyridine was suggested. Compounds BF₃, AlCl₃, SnCl₂, SiCl₄, ZnCl₂, SbCl₃, CaCl₂, BaI₂, CdI₂, and NaI can serve as the additives. Acylation of amino acids in such a solution (pH 5.2–5.3) with pentafluorophenyl esters of N^α-protected amino acids gave N^α-protected di- and tripeptides in a yield of more than 90%.

Key words: amino acids, peptides, aprotic solvents, Lewis acids

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: protres@ipr.serpukhov.su.