



УДК 547.466.96:602.017.1-018+616-097

ПОЛУЧЕНИЕ ПИРИДОКСИЛОВЫХ ЭФИРОВ АМИНОКИСЛОТ

© 1999 г. Л. Ю. Скляр[#], И. Н. Сбитнева, Н. А. Копина

Институт иммунологии РАМН, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24-2

Поступила в редакцию 19.10.98 г. Принята к печати 29.04.99 г.

Предложена многофункциональная защитная группа на основе производных 2-метил-3-гидрокси-4,5-дигидроксиметилпиридина (пиридоксина). Разработан препаративный метод синтеза исходных соединений – кеталей пиридоксина – с использованием тионилхлорида и получены новые производные аминокислот 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-иловые и 4',3-*O*-циклогексилденпиридоксин-5'-иловые эфиры, устойчивые к действию TFA, HCl, HBr, HF. Эти эфиры могут расщепляться омылением, аммонолизом, гидразиолизом, гидрогенолизом и фотолизом.

Ключевые слова: пиридоксин-5'-иловые эфиры аминокислот; новые карбоксильные защитные группы; кетали.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее было предложено использовать для пептидного синтеза несколько многофункциональных защитных групп, которые помимо основного назначения – блокировать определенные группы пептидной цепи, могут выполнять дополнительные функции: изменять растворимость, молекулярную массу, заряд, позволяют контролировать ход реакции визуально и с помощью УФ-спектроскопии, превращать стабильные защитные группы в активирующие [1]. Например, в твердофазном синтезе отделение побочных продуктов осуществляется простой процедурой – фильтрованием – за счет нерастворимости полимерного носителя [2]. Другим примером является упрощение процедуры выделения промежуточных продуктов пептидного синтеза путем солеобразования благодаря использованию пиколиловых эфиров аминокислот [3].

Наиболее часто полифункциональные защитные группы синтезируются на основе ароматических и реже гетероароматических соединений. Хотя в настоящее время известно несколько полифункциональных защитных групп на основе производных пиридина, индола, ксантина [3–10], более широкому использованию гетероароматических соединений препятствует труднодоступность исходного сырья и ограниченность методов введения необходимых заместителей в эти соеди-

нения. Поэтому определенный интерес представляет синтез замещенных пиридинов и пирролов на основе реакции производных этилена или ацетиленов с оксазолами [11], оксазолидонами [12], ацилированными эфирами [13], амидами и нитрилами α -аминокислот [14] (схема 1). Так, нами был разработан метод, позволяющий из нитрила или амида *N*-формил- α -аланина в одну стадию получить ряд замещенных пиридинов, в том числе производных витамина B₆ (пиридоксина) [16], заместители в котором могут быть далее селективно модифицированы [17] (схема 2), что и явилось начальным этапом исследований.

Следующий шаг наших исследований – разработка метода получения аминокислотных производных, в которых пиридоксильный остаток представлен как защитная и модифицирующая группа, а также может выступать в роли матрицы для внутримолекулярного ацилирования [18, 19]. Кроме того, учитывая биогенные свойства пири-

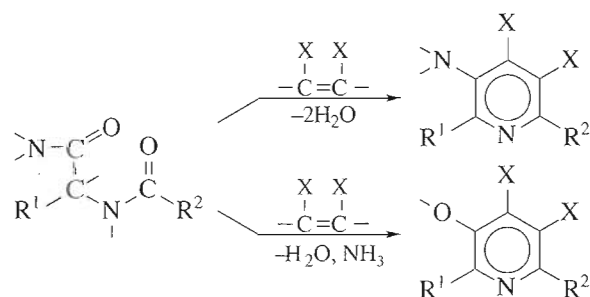


Схема 1. Синтез замещенных 3-аминопиридинов и 3-гидроксипиридинов из ацилированных производных α -аминокислот, пептидов. R¹ – радикал α -аминокислоты; R² – радикал ацила; X – –COOH, –COOR, –COOCO–, –CN.

Сокращения: B6 – пиридоксин, 2-метил-3-гидрокси-4,5-дигидроксиметилпиридин; Nps – *o*-нитрофенилсульфонил; R¹ – пиридоксил; iR¹ – 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-ил; cR¹ – 4',3-*O*-циклогексилденпиридоксин-5'-ил; iR² – 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-илоксикарбонил; Fmoc – флуоренилметилоксикарбонил; (Boc)₂O – ди-*tert*-бутилоксикарбонилпирокарбонат; DMAp – диметиламинопиридин; Abu – γ -аминоасляная кислота.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 111-83-44).

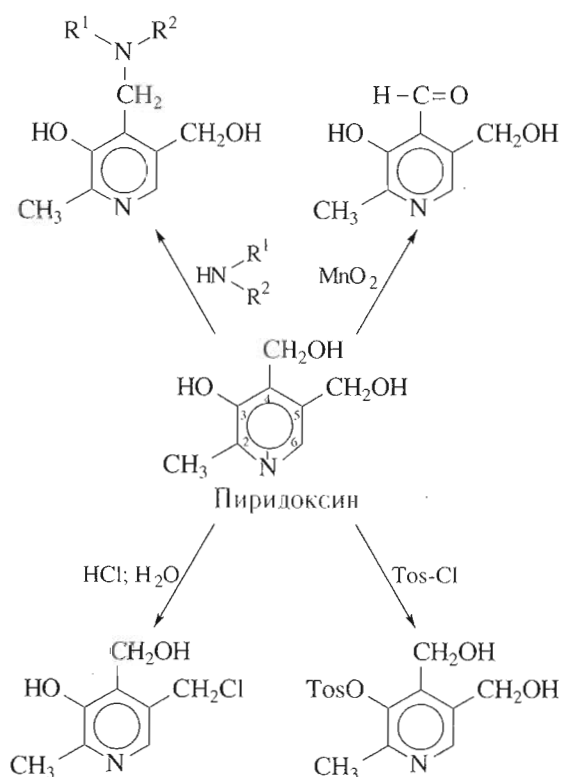


Схема 2. Селективная модификация различных гидроксильных групп пиридоксина без использования защитных групп. R^1 и R^2 – низшие алкилы.

доксильного остатка, он может играть роль синтона для получения биологически активных аналогов пептидов и пептидомиметиков.

Ключевым соединением для этих аминокислотных и пептидных производных является пиридоксин (пиридоксол, витамин B_6) – замещенный пиридин (2-метил-3-гидрокси-4,5-дигидрокси-метилпиридин), легко доступный продукт, получаемый в промышленности из α -аланина и его предшественников [16]. Пиридоксильные эфиры и уретаны разной степени устойчивости к расщепляющим реагентам могут быть получены благодаря наличию в молекуле пиридоксина трех разных по реакционной способности гидроксильных групп. Гидроксил в 3-м положении молекулы имеет характер фенольной гидроксильной группы, что позволяет синтезировать активированные эфиры и наблюдать перенос ацильных и аминокислотных остатков из 3-го в 4'-положение [19, 20]. Гидроксильные группы в 4'-м и 5'-м положениях, являясь "бензильными", сильно различаются по своей реакционной способности, например, 4-гидрокси-метильная группа в отличие от 5-гидрокси-метильной группы легко окисляется двуокисью марганца до альдегидной [18, 21] и аминируется [17]. Это создает предпосылки для одновременного синтеза разных пептидных цепей и их избирательного от-

щепления (окислением, фотолизом) при использовании пиридоксина в качестве полифункционального соединения или спейсера в твердофазном методе [18, 22]. Хорошо изученные физико-химические характеристики и биологические свойства [23, 24] пиридоксильных производных делают 3-гидрокси- и 3-аминопиридины привлекательными для использования в пептидной химии в качестве многофункциональных защитных групп, флуоресцентных меток и для получения модифицированных биологически активных соединений. Например, первые мультиплетные пептиды – антигенные олигомерные детерминанты – были получены на основе полифункциональных пиридино-в, пиридоксина [25]. В данной статье, в основном, рассматривается получение и использование пиридоксин-5'-ильных (5'-пиридоксильных, изопиридоксильных) эфиров аминокислот.

Мы предположили, что химические свойства пиридоксин-5'-ильных эфиров аминокислот могут быть аналогичны свойствам пиколиловых и изопиколиловых эфиров (пиридил-3-, пиридил-4-метильных эфиров). Однако наличие двух дополнительных свободных гидроксильных групп у пиридоксина делают его аминокислотные производные более растворимыми в воде, а блокирование свободных гидроксильных групп приводит к более гидрофобным производным по сравнению с пиколиловыми эфирами. Из-за полифункциональности молекулы пиридоксина избирательная этерификация 5'-ОН-группы N -защитненными аминокислотами возможна только после блокирования 4'- и 3'-ОН-групп. Для этих двух гидроксильных групп мы выбрали кетальную защитную группу, которая позволяет резко увеличить растворимость производных пиридоксина в органических растворителях и может быть удалена мягким кислотным гидролизом (80% HCOOH или 95% CF_3COOH при 0°C) без расщепления пептидных связей и без разрушения чувствительных к кислотному гидролизу аминокислотных остатков, таких как триптофан.

Известные методы синтеза кеталей пиридоксина (его реакцией с кетонами в присутствии кислоты в качестве катализатора) не позволяют синтезировать изомеры кеталей пиридоксина (4',3'-О- и 4',5'-О-) с высоким выходом и селективно [26]. Поэтому был разработан метод получения кеталей с использованием тионилхлорида как дегидратирующего агента [27]. С его помощью кетали могут быть получены быстро, селективно, с высоким выходом и, кроме того, этот метод хорошо воспроизводим и легко масштабируется. Выход отдельных изомеров кеталей зависит от соотношения кетона и тионилхлорида (схема 3). Кетальные производные можно использовать для селективного введения ацильных остатков. Таким путем мы получили ряд аминокислотных эфиров, в которых дополнительные гидроксильные группы пиридоксина блокированы бензильными остатками. Кроме того,

показано, что тозилый остаток может быть введен в 3-е положение молекулы пиридоксина селективно, без защиты двух других гидроксильных групп (схема 2).

Следующий шаг синтеза – конденсация *N*-защищенных аминокислот с соответствующим спиртовым компонентом – может быть выполнен обычным способом благодаря высокой растворимости оснований кеталей пиридоксина в таких органических растворителях как этилацетат, хлористый метилен, хлороформ, диметилформамид (схема 4). В качестве конденсирующих агентов использовали $(\text{Voc})_2\text{O}$, DCC, толуолсульфохлорид и кислотные ангидриды (фосфорный и трифтороуксусный). Для синтеза брали аминокислоты, *N*-защищенные *трет*-бутилоксикарбонильной, *o*-нитрофенилсульфонильной, флуоренилметоксикарбонильной и бензилоксикарбонильной группами. В случае использования кеталей пиридоксина в форме хлоргидрата, добавляли эквивалент третичного амина. При конденсации оснований кеталей пиридоксина с *N*-защищенными аминокислотами с помощью ди-*трет*-бутилпиридоксина (метод Позднева В.Ф. [28]) также необходимо использовать третичное основание. Наличие собственного третичного азота в основаниях кеталей пиридоксина недостаточно для катализа реакции и без добавления более основного амина реакция практически не идет. Добавление же такого слабого основания как пиридин, приводит к образованию желаемых эфиров. При использовании более сильных оснований – триэтиламина и диметиламинопиридина – скорость ацилирования увеличивалась.

Ход реакции этерификации и характер примесей легко контролируется ТСХ при визуализации в УФ-свете. Кроме того, аминокислоты, содержащие пиридоксильный остаток, проявляются реактивом Гиббса (2,6-дихлорхинон-4-хлоримид) [29] и нингидрином, а не содержащие – только нингидрином. Выход целевых продуктов (пиридоксильных эфиров *N*-ацилированных аминокислот) несколько увеличивается при дробном добавлении конденсирующих средств (DCC или $(\text{Voc})_2\text{O}$) в течение 2–3 ч. При использовании $(\text{Voc})_2\text{O}$ в качестве дегидратирующего агента наблюдалось образование ряда побочных продуктов, основным из которых был *трет*-бутиловый эфир соответствующей аминокислоты (не проявляется реактивом Гиббса). Удаление побочных продуктов не составляет проблемы из-за высокой липофильности и небольшого положительного заряда азота кеталей пиридоксина. Пиридоксильные эфиры *N*-ацилированных аминокислот экстрагируют этилацетатом, эфиром или смесью этих растворителей с гексаном и затем промывают водным раствором уксусной или лимонной кислоты без существенных потерь целевого продукта. Последующая промывка раствором бикар-

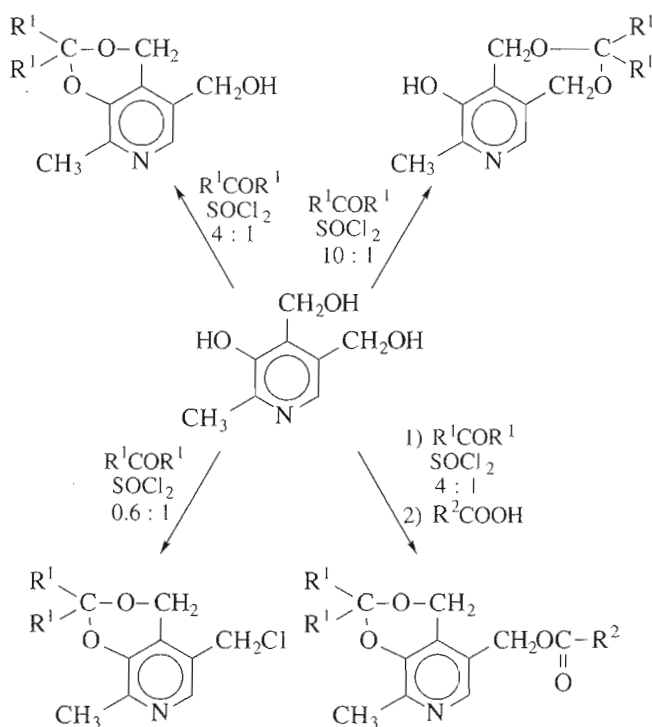


Схема 3. Получение кеталей (изопропилиден и циклогексилиден производных пиридоксина) с использованием тионилхлорида как дегидратирующего, хлорирующего и этерифицирующего агента. R^1 – метил или циклогексил; R^2 – низший алкил. (Указано объемное соотношение реагентов.)

боната натрия и упаривание органического растворителя позволяет выделить пиридоксильные эфиры аминокислот в виде оснований (таблица).

Хорошая кристаллизуемость пиридоксильных эфиров может быть использована при синтезе относительно труднодоступных эфиров дикарбоновых аминокислот. Так, ангидрид *N*-защищенной аспарагиновой кислоты (без добавления пиридина) при взаимодействии с основанием 4',3'-изопропилиденпиридоксина дает кристаллические внутренние соли α -эфиров с 70–80% выходом (схема 5). При плохой кристаллизации оснований пиридоксильных эфиров моноаминокарбоновых кислот их можно превратить в соль добавлением эквивалента минеральной либо органической кислоты (например, хлористо-водородной, пикриновой) с последующей промывкой полученных солей органическими растворителями. Образующиеся при удалении *N*-защитных групп незащищенные пиридоксильные аминокислотные эфиры, могут непосредственно использоваться в синтезе пептидов.

Кетальные защитные группы на пиридоксине, как известно [20], весьма устойчивы к щелочным воздействиям, поэтому идеальным сочетанием является использование щелочелавильной флуо-

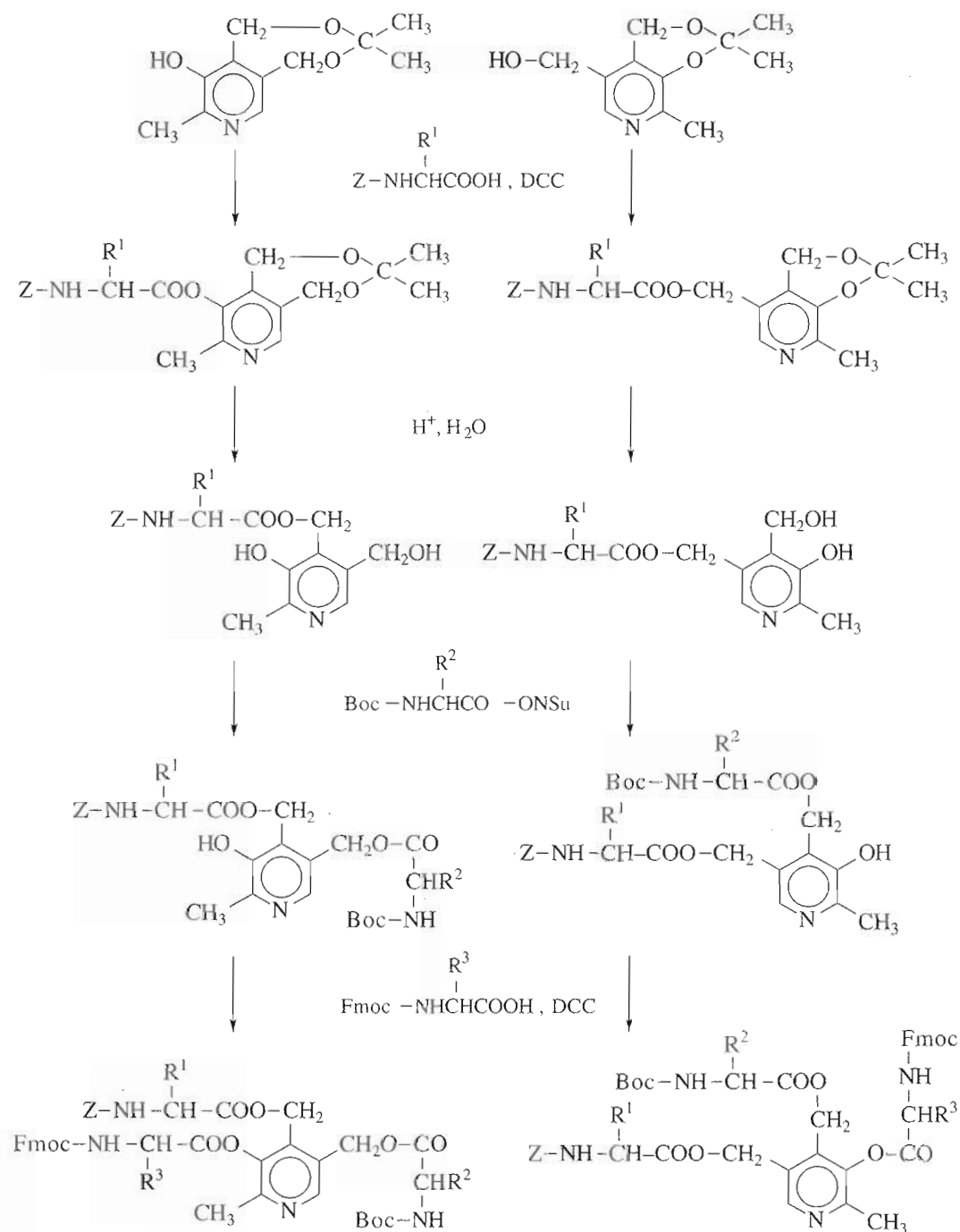


Схема 4. Синтез пиридоксильных эфиров аминокислот из изомеров кеталей пиридоксина – 4',5'-*O*-изопропилиден- и 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксина в синтезе пиридоксин-3-ильных эфиров, пиридоксин-4'-ильных эфиров, пиридоксин-5'-ильных эфиров, ди(пиридоксин-4',5'-ильных) и три(пиридоксин-4',5',3-ильных) эфиров.

ренилметоксикарбонильной группы в качестве временной *N*-защиты и пиридоксильной группы в качестве постоянной защиты [18]. Мы также изучили возможность применения более дешевых и широко используемых *трет*-бутилоксикарбонильных производных аминокислот. Было показано, что в безводных условиях кетальные груп-

пы на пиридоксильном остатке сохраняются и при действии кислотных реагентов (для удаления таких групп как *трет*-бутилоксикарбонильная и бензилоксикарбонильная). В этом случае для предохранения кеталей от действия следов влаги к реакционной смеси добавляется 3–5% (от общего объема) соответствующего кетона (ацетона

Физико-химические характеристики пиридоксин-5'-иловых эфиров *N*-защищенных аминокислот, полученных ДСС-методом

Соединение	<i>T</i> . пл., °С	[α] _D , 1% MeOH	λ _{max} , нм	ε, М ⁻¹ см ⁻¹	<i>R_f</i>		Выход, %
					Е	Г	
Fmoc-Phe-OiPyr5' · HCl*	187–189	-20.7	298	10271	0.75	0.97	77
Nps-Gly-OiPyr5'	128–130	–	285	12330	0.42	0.83	75
Boc-Phe-OiPyr5'	84–86	-18	297	8154	0.55	0.91	92
Boc-Phe-OiPyr5' · HCl*	164–166	-18	297	8154	0.55	0.91	89
Boc-Gly-OiPyr5'	94–96	–	296	7687	0.50	0.90	90
Boc-Gly-OiPyr5' · HCl*	138–140	–	296	7687	0.50	0.90	90
Boc-Asp-OiPyr5'***	132–134	-53.4	298	7865	0.18	0.89	81
Boc-Abu-OiPyr5'	85–87	–	296	7622	0.60	0.85	70
Z-Gly-OiPyr5'	163–165	–	299	9147	0.67	0.93	32
Z-Phe-OiPyr5'	174–175	-24.6	299	10116	0.70	0.94	83
Z-Phe-OCpYr5'	123–125	-22.5	299	10116	0.72	0.96	91

* Гидрохлорид получен обработкой основания эквивалентным количеством 5% HCl в эфире.

** Boc-Asp-OiPyr5' получен из ангидрида Boc-Asp-O.

или циклогексанона). Если необходимо удалить кетальную защиту, используется кислотный раствор (CF₃COOH, HBr/CH₃COOH) с добавлением 3–5% воды. Пиридоксин-5'-иловые эфиры аминокислот по свойствам сходны с бензиловыми эфирами, но, как и пиколиновые, более устойчивы к действию сильных кислотных реагентов. Например, пиридоксин-5'-иловый эфир глицина сохраняется даже после двухчасового воздействия жидким HF.

Дополнительные эксперименты по изучению устойчивости пиридоксидовых эфиров к действию жидкого HF показали, что после обработки 4',5'-3-три-*O*-бензоилпиридоксина [20] жидким HF в течение 2 ч при 0°C эфирные связи в 4'- и 5'-положениях не расщепляются и 4',5'-ди-*O*-бензоилпиридоксин получается с количественным выходом. Обработка этого же триэфира бромистым водородом в трифторуксусной кислоте в течение 1 ч не приводит к расщеплению эфирных связей. Устойчивость пиридоксидовых эфиров к действию кислотных агентов и возможность использования *N*-флуоренилоксикарбонильных, *N*-бензилоксикарбонильных и *N*-*tert*-бутилоксикарбонильных производных аминокислот позволяет осуществить синтез трех разных пептидных цепей, связанных с пиридоксидовым ядром (см. схему 4), что особенно важно в синтезе мультиплетных пептидов, пептидомиметиков и ингибиторов протеиназ [30, 31]. В то же время пиридоксин-5'-иловые эфиры аминокислот легко расщепляются в условиях гидрогенолиза, аммонолиза и гидразиолиза. Предварительные эксперименты показали легкость разрушения эфирной связи у пиридоксидовых эфиров в условиях фотолиза. По-видимо-

му, эти эфиры могут быть расщеплены действием натрия в жидком аммиаке и электрохимическим восстановлением. Снятие 4',3-*O*-кетальной защиты несколько уменьшает скорость щелочного омыления пиридоксидовых эфиров (рисунок), тогда как скорость расщепления фотолизом при этом резко возрастает. Омыление 5'-пиридоксидовых эфиров со свободной гидроксильной группой по 3-му положению в щелочно-боратном буфере с pH 10.5, по-видимому, сопровождается ионизацией (образованием "фенолята"), повышением электронной плотности, что и приводит к некоторому уменьшению скорости гидролиза, несмотря на ожидаемый каталитический эффект гидроксильной группы в 4'-положении. В случае фотолиза (возможно, проходящего через стадию

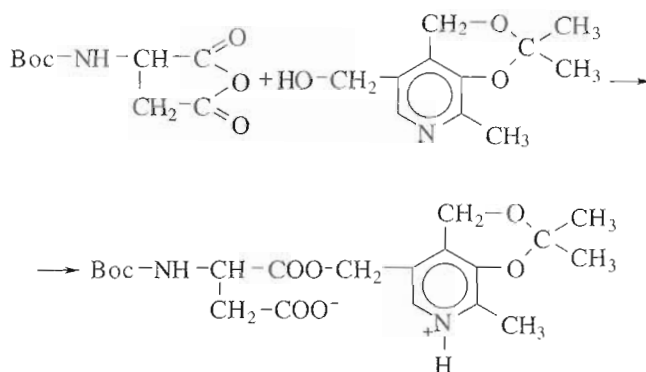


Схема 5. Синтез кристаллической внутренней соли 3,4'-изопропилиденпиридоксил-5'-илового α-эфира *N*-*tert*-бутилоксикарбониласпарагиновой кислоты из ангидрида.

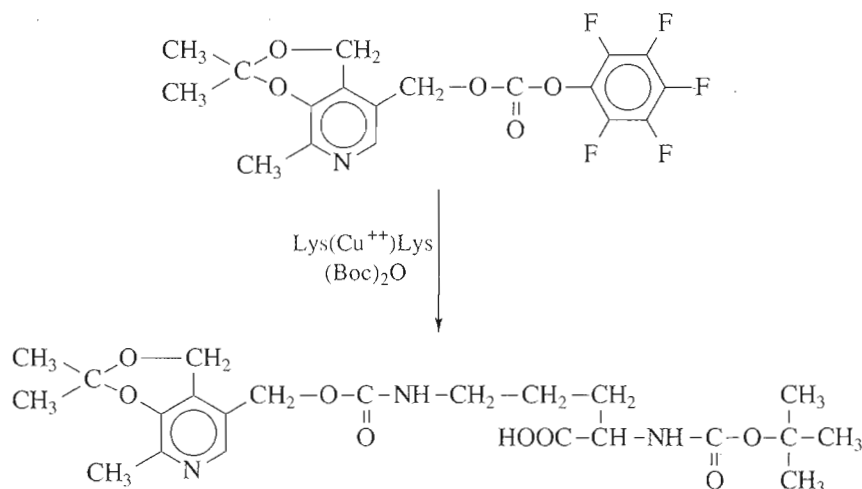


Схема 6. Реагент для введения 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-ил-оксикарбонильной группы (iPoc5') в аминокислотные производные. Показан синтез Boc-Lys(iPoc5')-OH [32].

образования хиноидной метидной структуры и миграцию ацила из 5'- в 4'-положение молекулы) наблюдается обратный эффект. Перспективным является получение новых производных пиридоксина, обладающих поглощением при больших длинах волн, что позволяет повысить селективность расщепления фотолизом эфирной связи пиридоксилового остатка.

Синтез пептидов с использованием водорастворимых пиридоксильных эфиров аминокислот представляет интерес в связи с перспективой применения экологичных промышленных технологий – ультрафильтрации, обратного осмоса, ферментативного синтеза.

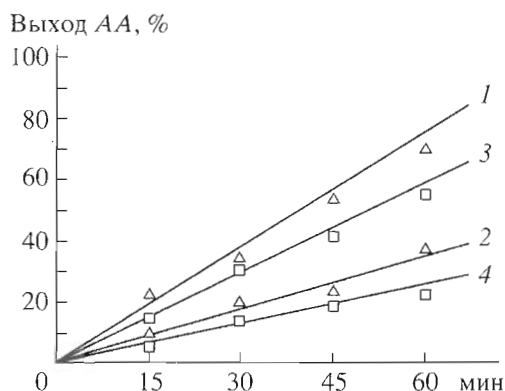
Ранее нами была предложена новая *N*-защитная группа – 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-ок-

сикарбонильная (iPoc5') [32] на основе 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксина, аналогичная по своим свойствам изоникотинилоксикарбонильной группе Вебера [33]. Лизиновое производное Boc-Lys(iPoc5')-OH (схема 6) было использовано в синтезе пептидов для диагностики ВИЧ [32]. Условия синтеза соответствующих производных аминокислот изучаются. Так же как и пиридоксин-5'-иловые эфирные производные аминокислот, уретановые производные особенно перспективны в качестве строительных блоков в синтезе пептидомиметиков и ингибиторов металлопротеиназ [34, 35].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуры плавления (нескорректированные) определяли на приборе Voetius. ТСХ выполняли на силикагелевых пластинках (Kieselgel GF 254, Merck) в системах растворителей: этилацетат–метанол–уксусная кислота, 10 : 1 : 0.1 (А); хлороформ–метанол, 3 : 1 (Б); хлороформ–метанол–уксусная кислота, 3 : 1 : 0.3 (В); *n*-бутанол–уксусная кислота–вода 3 : 1 : 1 (Г); 2-пропанол–25% аммиак, 3 : 7 (Д); этилацетат (Е); ацетон–диоксан–25% аммиак, 9 : 9 : 2 (Ж). Углы оптического вращения измерялись на приборе Perkin-Elmer Model 141. Состав всех синтезированных пептидов подтвержден данными аминокислотного анализа, выполненного на аминокислотном анализаторе Biotronik LC 5001 после гидролиза 6 н. HCl при 110°C в течение 18–24 ч. Все синтезированные соединения охарактеризованы данными элементного анализа.

4',3-*O*-Изопропилиденпиридоксин. К суспензии тонкоизмельченного хлоргидрата пиридоксина (20.56 г, 0.1 моль) в смеси ацетона (30 мл) и хлороформа (10 мл) при постоянном перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре равны-



Гидролиз (боратный буфер pH 10.5) пиридоксин-5'-иловых эфиров (0.01 М) глицина и фенилаланина с 4',3-*O*-изопропилиденовой группой на пиридоксине Н-Gly-OiPyr5' (1); Н-Phe-OiPyr5' (2) и без нее (Н-Gly-OPyr5' (3); Н-Phe-OPyr5' (4). Показано содержание свободных аминокислот в (%) по данным аминокислотного анализа.

ми порциями добавляли тионилхлорид (10 мл, 0.13 моль), перемешивали еще 4 ч. Добавляли эфир, выпавший осадок отфильтровывали, промывали смесью ацетона и эфира (1 : 1) и высушивали. Выход хлоргидрата 24.6 г (100%). Т. пл. 206–208°C, R_f 0.8 (Ж). Свободное основание получали нейтрализацией хлоргидрата 10% K_2CO_3 при 0°C, промывали водой и высушивали. Выход 19.2 г (91%). Т. пл. 182–183°C.

4',3-*O*-Циклогексилденпиридоксин получали аналогично 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксину. Выход хлоргидрата 93%. Т. пл. 215–216°C, R_f 0.9 (Ж). Выход свободного основания 90%. Т. пл. 128–130°C.

4',5'-*O*-Изопропилиденпиридоксин. К смеси 4.12 г (0.02 моль) тонкоизмельченного хлоргидрата пиридоксина и 50 мл ацетона при –10°C прибавляли 6 мл (0.08 моль) тионилхлорида. Суспензию перемешивали 2 ч при 0°C и затем 5 ч при 20°C. Реакционную смесь разбавляли 50 мл эфира, отфильтровывали осадок, промывали его смесью ацетона и эфира (1 : 1), эфиром и высушивали в вакууме при 20°C. Выход хлоргидрата 4',5'-*O*-изопропилиденпиридоксина 4.83 г (98%). Т. пл. 195–198°C. После перекристаллизации из спирта т. пл. 205–207°C. Свободное основание выделяли путем обработки хлоргидрата насыщенным раствором поташа при 0°C. Получили 4.12 г (90% выход). Т. пл. 183–185°C.

Типовые методики получения пиридоксин-5'-иловых эфиров *N*-защищенных аминокислот на примере 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-илового эфира *N*^α-*трет*-бутилоксикарбонилглицина (Woc-Gly-OiPyr5'):

а) с помощью $POCl_3$. К охлажденному до 0°C раствору 0.408 г (2 ммоль) 4',3-изопропилиденпиридоксина, 0.387 г (2.2 ммоль) Woc-Gly-OH и 1.6 мл (20 ммоль) пиридина в 20 мл хлороформа при постоянном перемешивании в течение 30 мин равными порциями добавляли раствор 0.244 г (2.6 ммоль) $POCl_3$ в 10 мл хлороформа. Смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре, упаривали в вакууме, остаток растворяли в 20 мл этилацетата, промывали 5% $NaHCO_3$, водой, сушили безводным $MgSO_4$ и упаривали в вакууме досуха. Остаток кристаллизовали растиранием под гексаном, перекристаллизовывали из смеси этилацетат-гексан, получали 0.674 г (92%) 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-илового эфира *N*^α-*трет*-бутилоксикарбонилглицина с т. пл. 94–96°C, R_f 0.5 (Е), 0.9 (Г).

б) с помощью $(Woc)_2O$. К охлажденному до 0°C раствору 0.408 г (2 ммоль) 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксина, 0.387 г (2.2 ммоль) Woc-Gly-OH и 0.18 мл (0.22 ммоль) пиридина в 20 мл хлороформа при постоянном перемешивании в течение 90 мин равными порциями добавляли раствор 0.50 г

(2.6 ммоль) $(Woc)_2O$ в 10 мл хлороформа. Смесь перемешивали 72 ч при комнатной температуре, упаривали в вакууме, остаток растворяли в 20 мл этилацетата, промывали 5% $NaHCO_3$, водой, сушили безводным $MgSO_4$ и упаривали в вакууме досуха. Остаток кристаллизовали растиранием под гексаном, перекристаллизовывали из смеси этилацетат-гексан, получили 0.674 г (92%) 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-илового эфира *трет*-бутилоксикарбонилглицина. Характеристики совпадают с данными по образцу, полученному методом а).

в) с помощью DCC. К охлажденному до 0°C раствору 2.3 г (10 ммоль) 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксина, 1.75 г (10.1 ммоль) Woc-Gly-OH и 0.122 г (1.0 ммоль) DMAP в 80 мл хлороформа, добавляли раствор 2.06 г (10 ммоль) DCC в 30 мл хлороформа при постоянном перемешивании в течение 2 ч равными порциями. Смесь перемешивали 12 ч при комнатной температуре, отфильтровывали мочевину, фильтрат упаривали в вакууме, растворяли в этилацетате, промывали 5% $NaHCO_3$, водой, сушили безводным $MgSO_4$ и упаривали в вакууме досуха. Остаток кристаллизовали растиранием под гексаном, получили 3.4 г (90%) идентичного образцу, полученному по методу а).

Растворение сырого продукта в эфире и прибавление к нему эквивалента 2,4,6-тринитрофенола приводило к быстрому и количественному образованию пикрата Woc-Gly-OiPyr5' с т. пл. 125–127°C. Обработка Woc-Gly-OiPyr5' эквивалентным количеством 5% раствора HCl в эфире дает с количественным выходом соответствующий хлоргидрат Woc-Gly-OiPyr5' с т. пл. 138–140°C.

4',3-*O*-Изопропилиденпиридоксин-5'-иловый эфир *N*^α-*трет*-бутилоксикарбонилфенилаланина (Woc-Phe-OiPyr5'), 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-иловый эфир *N*^α-флуоренилметилоксикарбонилфенилаланина (Fmoc-Phe-OiPyr5' · HCl) и 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-иловый эфир *N*^α-бензилоксикарбонилфенилаланина (Z-Phe-OiPyr5') получали методом, описанным выше в) (таблица).

4',3-*O*-циклогексилденпиридоксин-5'-иловый эфир бензилоксикарбонилфенилаланина (Z-Phe-OcPyr5') был получен аналогично предыдущей методике с использованием 4',3-*O*-циклогексилденпиридоксина (таблица).

4',3-*O*-Изопропилиденпиридоксин-5'-иловый эфир *N*^α-бензилоксикарбонилглицина (Z-Gly-OiPyr5') получали двумя методами:

а) с помощью DCC. К раствору 1.23 г (5 ммоль) хлоргидрата 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксина и 1.04 г (5 ммоль) Z-Gly-OH в 20 мл диметилформамида, содержащего 5 мл пиридина, добавляли 1.1 г (5.5 ммоль) DCC. Через 12 ч выпавшую *N,N'*-ди-

циклогексилмочевину отфильтровывали, раствор упаривали в вакууме и остаток растворяли в этилацетате, промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия, водой и высушивали над хлористым кальцием. Этилацетат упаривали до небольшого объема, и выпавшие кристаллы промывали эфиром, перекристаллизовывали из этилацетата. Получили 0.6 г (32%). Т. пл. 163–165°C. R_f 0.6 (E).

б) с помощью *n*-толуолсульфохлорида. К раствору 1.23 г (5 ммоль) хлоргидрата 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксина и 1.04 г (5 ммоль) бензилоксикарбонилглицина в 20 мл диметилформамина, содержащего 5 мл пиридина добавляли при 0°C 1.95 г (5 ммоль) *n*-толуолсульфохлорида и выдерживали 2 ч при 20°C. Раствор выливали на лед с водой и экстрагировали этилацетатом. Дальнейшую обработку этилацетатного раствора проводили аналогично вышеописанной методике а). Выход Z-Gly-OiPyr5' 0.58 г (30%).

α -4',3-*O*-Изопропилиденпиридоксин-5'-иловый эфир N^{α} -трет-бутилоксикарбониласпарагиновой кислоты (Woc-Asp-OiPyr5'). Раствор 35 г (160 ммоль) ангидрида N^{α} -трет-бутилоксикарбониласпарагиновой кислоты [36] в 100 мл хлороформа прикапывали в течение 1 ч к 34 г (160 ммоль) 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксина в 100 мл хлороформа при 0°C. После размешивания в течение 18 ч при 20°C к образовавшейся суспензии прибавляли 100 мл гексана. Выпавший кристаллический осадок внутренней соли отфильтровывали, промывали гексаном. Получили 56 г (81%) Woc-Asp-OiPyr5'. Аммонолиз аликвотной части приводит к количественному выходу Woc-Asp(NH₂)-OH.

4',5'-Ди-*O*-бензоилпиридоксин-3-иловый эфир N^{α} -бензилоксикарбонилглицина Z-Gly-O(4',5'Bz₂)Pyr3. К раствору 1.9 г (5 ммоль) 4',5'-ди-*O*-бензоилпиридоксина и 1.2 г (6 ммоль) Z-Gly-OH в 50 мл диоксана добавляли 1.3 г (6 ммоль) DCC. Через 12 ч выпавшую *N,N'*-дициклогексилмочевину отфильтровывали и раствор упаривали в вакууме. Твердый остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетат–петролейный эфир (3 : 1). Выход Z-Gly-O(4',5'Bz₂)Pyr3 1.8 г (64%). Т. пл. 135–137°C. R_f 0.75 (E)

5'-*O*-Бензоилпиридоксин-4'-иловый эфир N^{α} -бензилоксикарбонилглицина Z-Gly-O(5'Bz)Pyr4'. К раствору 2.72 г (0.01 моль) 5'-*O*-бензоилпиридоксина, 2.09 г (0.01 моль) бензилоксикарбонилглицина в 100 мл диоксана при 0°C добавляли 2.26 г (0.011 моль) DCC. Через 48 ч выпавшую *N,N'*-дициклогексилмочевину отфильтровывали и раствор упаривали в вакууме. Кристаллический остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетат–петролейный эфир (1 : 1). Выход Z-Gly-O(5'Bz)Pyr4' 1.7 г (36%). Т. пл. 142–144°C, R_f 0.38 (E).

4'-*O*-(N^{α} -Бензилоксикарбонилглицил)-5'-*O*-бензоилпиридоксин-3-иловый эфир N^{α} -трет-бутилоксикарбонилглицина Woc-Gly-O(4'ZGly,5'Bz)Pyr3. К раствору 0.46 г (1 ммоль) Z-Gly-O(5'Bz)Pyr4' и 0.2 г (1.1 ммоль) Woc-Gly-OH в 20 мл диоксана добавляли раствор 0.21 г (1.1 ммоль) DCC в 5 мл диоксана. Через 48 ч выпавшую *N,N'*-дициклогексилмочевину отфильтровывали и раствор упаривали в вакууме. Остаток растворяли в этилацетате, промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия, водой, высушивали над сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Кристаллический остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетат–петролейный эфир (1 : 1). Выход Woc-Gly-O(4'ZGly,5'Bz)Pyr3 0.53 г (73%). Т. пл. 128–130°C, R_f 0.48 (E).

Расщепление пиридоксил-5'-иловых эфиров:
а) *Щелочное омыление.* К раствору 0.45 г (1 ммоль) Woc-Phe-OiPyr5' в 5 мл диоксана при 20°C добавляли 1.2 мл 1 н. NaOH, выдерживали 1 ч и диоксан отгоняли в вакууме. Водный остаток подкисляли при 0°C 2 н. H₂SO₄ и экстрагировали хлороформом. Хлороформ упаривали в вакууме, получили 0.24 г (91%) Woc-Phe-OH.

б) *Гидрогенолиз.* 0.45 г (1 ммоль) Woc-Phe-OiPyr5' растворяли в 5 мл метанола и гидрировали 18 ч с 0.3 г 10% Pd/C. Катализатор отфильтровывали, промывали метанолом. Фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе, промывали 2 н. H₂SO₄, высушивали над Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Получили 0.2 г (88%) Woc-Phe-OH.

в) *Аммонолиз.* Раствор 0.48 г (1 ммоль) Z-Phe-OiPyr5' в 10 мл насыщенного при 0°C раствора NH₃ в метаноле выдерживали 24 ч при 0°C и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 50 мл этилацетата, промывали 10% раствором лимонной кислоты, 5% раствором NaHCO₃, водой. Этилацетатный раствор высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали в вакууме. Получили 2.13 г (72%) Z-Phe-NH₂.

г) *Гидразинолиз.* Раствор 0.34 г (0.9 ммоль) Woc-Gly-OiPyr5' в 5 мл безводного этанола, содержащего 0.3 мл гидразингидрата, выдерживали 18 ч при 20°C и упаривали. Остаток кристаллизовался при растирании с эфиром. Получили 0.12 г (78%) Woc-Gly-NHNH₂. Т. пл. 115–116°C.

д) *Фотолиз.* К 4.6 мг (0.01 ммоль) Woc-Phe-OiPyr5' добавили 0.5 мл 95% CF₃COOH, через 1 ч раствор упарили в вакууме и остаток растворили в 1.5 мл 50% метанола, содержащего 2 мг NH₄Cl и облучали 18 ч лампой "SYLVAVIA" Blacklight Blue BW-8W. Аминокислотный анализ раствора показал наличие фенилаланина (5.1 мкмоль/мл, выход 77%). В результате фотолиза 5'-пиридоксилового эфира глицина в этих же условиях получили глицин с 92% выходом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гершкович А.А. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 869–899.
2. Merrifield R.B. // J. Am. Soc. 1963. V. 85. P. 2149–2154.
3. Camble R., Carmer R., Young G.T. // J. Chem. Soc. (C). 1969. P. 1911–1916.
4. Bernatawicz M.S., Matsueda R., Matsueda G.R. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1986. V. 28. P. 107–112.
5. Kunz H., Birnbach S. // Tetrahedron Lett. 1984. V. 25. P. 3567–3570.
6. Zalipsky S., Chang J.L., Albercio F., Barany G. // React. Polym. 1994. V. 22. P. 243.
7. Halstrom J., Brunfeldt K., Kovacs K. // Acta Chem. Scand. 1979. V. B33. P. 685.
8. Shimonishi Y., Sakakibara S., Akabori S. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1962. V. 35. P. 1966–1970.
9. Kemp D.S., Hoynq Ch. F. // Tetrahedron Lett. 1975. V. 52. P. 4625–4628.
10. Puss Sh., Amit B., Patchornik A. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. P. 7674–7675.
11. Кондратьева Г.Я., Хуан Чжи Хен // Докл. АН СССР. 1961. Т. 141. С. 628–631.
12. McDermott J.R., Benoiton L. // Can. J. Chem. 1973. V. 51. P. 2562–2570.
13. Kuhn R., Osswald G. // Chem. Ber. 1956. I.g. 89. H. 6. S. 1423–1442.
14. Скляр Л.Ю., Кочеткова Г.Г. Способ получения 2-метил-3-амино-4,5-дицианпиридина. А. с. 618940 СССР. 1976.
15. Скляр Л.Ю., Кочеткова Г.Г. Способ получения 3-аминопиридинов. А. с. 858315 СССР. 1978.
16. Скляр Л.Ю., Кочеткова Г.Г. Способ получения пиридоксина. А. с. 976650 СССР. 1978.
17. Скляр Л.Ю., Хрусталева Н.А. Способ получения пиридоксиламинов. А. с. 654613 СССР. 1976.
18. Sklyarov L., Nikolaev A., Kopina N. // Proc. of the 20th EPS. Tubingen 1988. /Eds Jung G., Bayer E., Gruter W. Berlin, New York, 1989. P. 85–87.
19. Скляр Л.Ю. // Тез. VI Всесоюз. симп. по химии белков и пептидов. Рига, 1983. С. 290–291.
20. Korytnyck W., Paul B. // J. Org. Chem. 1967. V. 32. P. 3791.
21. Imperiali B., Roy R. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 12083–12084.
22. Holmec C.P., Pybak C.M. // Peptides/ Eds Hoges R.S., Smith J.A. Leiden: Escom, 1994. P. 992.
23. Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. // Докл. АН СССР. 1952. Т. 85. С. 1115–1118.
24. Metzler D.E., Harris C.M., Johnson R.J., Siano D.B., Thomson J.A. // Biochemistry. 1973. V. 12. P. 5377–5392.
25. Скляр Л.Ю., Копина Н.А., Золина Н.Н. // Мат. Всес. биохим. конгресса. М.: Наука, 1986. С. 29–30.
26. Korytnyck W. // J. Org. Chem. 1962. V. 27. P. 3724–3726.
27. Скляр Л.Ю. Способ получения изопропилиденовых производных пиридоксина. А. с. 436057 СССР. 1974.
28. Позднев В.Ф. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 280–286.
29. Dacre J.C. // Anal. Chem. 1971. V. 43. P. 589–591.
30. Tam J.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 5409.
31. Скляр Л.Ю., Николаев А.Ю., Копина Н.А. // Итоги науки и техники. Иммунология. 1988. Т. 26. С. 37–42.
32. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Фомина Л.Д., Сидорович И.Г., Скляр Л.Ю., Лиознер А.Л., Николаев А.Ю., Николаева И.А., Иващенко М.Е., Павликов С.П., Ефремова Е.В., Рассули А.М. Пептид, связывающий антитела к вирусу иммунодефицита человека. А. с. 1541821 СССР. 1989.
33. Veber D., Brady S.F., Hirschmanne R. // Proc. Third Am. Rep. Sym./Ed. Mejezhofer J. Ann Arbor, 1972.
34. Sklyarov L.Yu., Sbitneva I.N., Kopina N.A., Kugaevskaja E.V. // J. Am. Biotech. Lab. 1994. № 8. P. 12–13.
35. Kiso Y., Mimoto T., Enomoto H., Kisanuki S., Moriwaki H., Kimura T., Hattori N., Hayashi H., Takada K., Akaji K., Kageyama S., Mitsuya H. // Peptides / Ed. Maia H.L.S. Leiden: Escom, 1995.
36. Schroder E., Klieger E. // Ann. Chem. Liebigs. 1964. V. 663. P. 208.

The Synthesis of Amino Acid Pyridoxyl Esters

L. Yu. Sklyarov[#], I. N. Sbitneva, and N. A. Kopina

Institute of Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 24-2, Moscow, 115478 Russia

A multifunctional protective group was suggested on the basis of 4',5'-dihydroxymethyl-3-hydroxy-2-methylpyridine (pyridoxine). A preparative method for the synthesis of the starting compounds, pyridoxine ketals, with the use of thionyl chloride was developed, and some new amino acid derivatives, 3,4'-O-isopropylidene-5'-pyridoxyl and 3,4'-O-cyclohexylidene-5'-pyridoxyl esters, were obtained. These resist the action of trifluoroacetic, hydrochloric, hydrobromic, and hydrofluoric acids and can be cleaved by saponification, ammonolysis, hydrazinolysis, hydrogenolysis, or photolysis.

Key words: amino acid 5'-pyridoxyl esters, new carboxyl protective groups, ketals

[#] To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 111-8344.