



УДК 547.466/461.4.057 : 542.95

**СИНТЕЗ N-ОКСИСУКЦИНИМИДНЫХ ЭФИРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ
КИСЛОТ И КАРБОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ ПОЛИМЕРОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ N-ТРИФТОРАЦЕТОКСИСУКЦИНИМИДА**

*Андреев С. М., Сидорова М. В., Ракова О. А.,
Цветков Д. Е., Фомина Л. А.*

Институт иммунологии Министерства здравоохранения СССР, Москва

Разработан простой способ синтеза активированных N-оксисукцинимидных эфиров органических кислот и карбоксилсодержащих полимеров с использованием трансэтерифицирующего реагента — N-трифторацетоксисукцинимид. Этерификация осуществляется в апротонных растворителях в присутствии пиридина в течение 20–60 мин при 20° С. В указанных условиях получены N-оксисукцинимидные эфиры полиакриловой кислоты, сополимера винилпирролидона с малеиновым ангидридом и шиятого сополимера стирола с малеиновым ангидридом, содержащего остатки ε-аминокапроновой кислоты, сукцинилизированного бычьего сывороточного альбумина, ряда жирных и дикарбоновых кислот, Вос- и Z-аминокислот.

В настоящее время в различных областях биоорганической химии, молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии широкое распространение получили высокомолекулярные полимеры, модифицированные природными лигандами. К подобным соединениям относятся иммобилизованные ферменты, сорбенты для аффинной хроматографии, в том числе иммуносорбенты, полимерные фазы для газожидкостной хроматографии, а также синтетические антигены на основе белков, пептидов, полисахаридов и других природных гаптенев.

Получение перечисленных соединений предполагает наличие полимерного носителя с активированной функциональной группой, за счет которой осуществляется ковалентное связывание необходимого лиганда.

Для активации карбоксильных групп в полимерах, как правило, применяется карбодимидный метод. Однако при использовании карбодимидов связывание лиганда с полимерной матрицей происходит неселективно, т. е. затрагиваются различные функциональные группы как носителя, так и лиганда. Это может приводить к образованию поперечных сшивок в полимерной матрице, модификации ответственных за проявление биологической активности фрагментов природного лиганда и т. п. Показано, что при получении пептидно-белковых конъюгатов карбодимидным методом помимо целевых соединений неизбежно образуются нежелательные продукты модификации белковой матрицы карбодимидом [1]. Последние индуцируют синтез специфических антител, искажающих результаты биологических экспериментов [1]. Кроме того, применение нерастворимых карбодимидов способствует загрязнению полимерного материала трудноотделимыми балластными примесями (например, дивинилоксимочевинной).

Настоящая работа посвящена разработке простого способа активации карбоксильных групп в карбоксилсодержащих полимерах с помощью трансэтерифицирующего реагента — N-трифторацетоксисукцинимид. N-Трифторацетоксисукцинимид (TFS) был предложен Сакакибарой в 1965 г. [2] для получения активированных N-оксисукцинимидных эфиров N-защищенных аминокислот, однако широкого распространения в пептидной химии не получил из-за сложности его синтеза. Усовершен-

Принятые сокращения: Аса — ε-аминокапроновая кислота, HONSu — N-оксисукцинимид, DMF — диметилформамид, BSA — бычий сывороточный альбумин, TFS — N-трифторацетоксисукцинимид, Py — пиридин.

ствование способа получения этого реагента [3] позволило нам успешно применить TFS для синтеза активированных N-оксисукцинимидных эфиров ряда природных и синтетических полимеров.

Применение TFS позволяет избежать вышеописанных трудностей, связанных с использованием карбодимида, так как он избирательно реагирует с карбоксильными функциями модифицируемого соединения. Этот реагент и продукты его разложения хорошо растворимы в большинстве органических растворителей и в воде, что обеспечивает их полное отделение от целевых соединений. Кроме того, известно, что активированные N-оксисукцинимидные эфиры (в том числе и полимерные) обладают высокой селективностью и взаимодействуют (в отсутствие специальных добавок) только с амино- и сульфгидрильными группами, не затрагивая других функций природных лигандов [4].

Данный реагент может быть использован для получения N-оксисукцинимидных эфиров как растворимых, так и нерастворимых сшитых полимеров.

Этерификацию карбоксилсодержащих полимеров осуществляли при действии 2–4-кратного избытка TFS (по отношению к содержанию карбоксильных групп) в DMF в присутствии 2 экз. пиридина. Выходы соответствующих эфиров были близки к количественным, время проведения реакции не превышало 1 ч. Нерастворимые в DMF синтетические полимеры — полиакриловая кислота и сополимер винилпирролидона с малеиновым ангидридом, модифицированный ϵ -аминокапроновой кислотой, при добавлении TFS полностью растворялись в той же среде уже через несколько минут. Аналогичная картина наблюдалась с плохо растворимым в DMF сукцинилизированным BSA. По-видимому, полианионы плохо сольватируются в апротонных средах, а в результате этерификации их заряд блокируется, что резко повышает их растворимость. Таким образом, становится возможным проводить последующие реакции модификации подобных полимеров в безводных средах, что в ряде случаев более приемлемо (например, для гидролитически лабильных или нерастворимых в воде лигандов).

Образование полимерного N-оксисукцинимидного эфира контролировали с помощью ИК-спектроскопии. Количественную оценку степени этерификации осуществляли путем спектрофотометрического определения отщепленного N-оксисукцинимиды после обработки полимерного активированного эфира гидроокисью аммония [5]. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 1.

N-Оксисукцинимидные эфиры полимерных носителей, полученные с использованием TFS, в дальнейшем были применены в синтезе искусственных антигенов*.

Предлагаемый метод оказался удобным для активации карбоксильных групп различных органических кислот. С помощью TFS были получены соответствующие активированные эфиры ряда жирных и дикарбоновых кислот (табл. 2), которые часто находят применение в качестве реагентов для модификации пептидов и белков, а также бифункциональных сшивающих реагентов. Данный метод в случае дикарбоновых кислот позволяет избежать образования внутренних ангидридов.

N-Трифторацетоксисукцинимид применялся также при получении активированных эфиров N-защищенных аминокислот. При этом выходы соответствующих N-оксисукцинимидных эфиров в большинстве случаев превышали выходы аналогичных соединений, синтезированных карбодимидным методом [6] (табл. 3), а их константы соответствовали известным значениям [6, 7].

Экспериментальная часть

В работе использовали N-оксисукцинимид (Fluka, Швейцария), производные аминокислот (Serva, ФРГ; Reanal, ВНР), BSA (Sigma, США), стиромаль (сшитый диаминодифенилоксидом сополимер стирола с малеи-

* Данные будут опубликованы отдельно.

Характеристика N-оксисукцинимидных эфиров карбоксилсодержащих полимеров, полученных с использованием N-трифторацетоксисукцинимид

Полимер	Содержание COOH-групп, ммоль/г	Содержание ONSu-групп, ммоль/г		Степень этерификации, %
		найдено *	вычислено **	
Полиакриловая кислота	13,8	5,07	5,92	85,6
Сополимер винилпирролидона с малеиновым ангидридом, модифицированный Аса	3,0	2,30	2,32	99,1
Стиромаль, модифицированный Аса	2,3	1,78	1,80	98,9
Сукцинилированный BSA		0,79		

* Найдено по результатам спектрофотометрического определения HONSu.

** Вычислено исходя из количественной этерификации карбоксильных групп.

Таблица 2

Характеристика N-оксисукцинимидных эфиров органических кислот, полученных с использованием N-трифторацетоксисукцинимид

Органическая кислота	Выход ONSu-эфира, %	Температура плавления, °C	
		эксперимент.	литерат.
Каприновая	92,0	68–69	69–70 [11]
Пальмитиновая	93,3	90	91 [11]
Янтарная	83,0	305–306	305–306 [3]
Глутаровая	96,7	139–141	—
Субериновая	97,8	167–169	159–163 [12]

Таблица 3

Характеристика N-оксисукцинимидных эфиров N-защищенных аминокислот, полученных с использованием N-трифторацетоксисукцинимид

Производное аминокислоты	Выход, %	Выход по [6], %	Производное аминокислоты	Выход, %	Выход по [6], %
Boc-Gly-ONSu	84,3	62	Boc-Glu(OBzl)-ONSu	94,5	—
Boc-Ala-ONSu	87,5	71	Boc-Tyr(Bzl)-ONSu	84,0	—
Boc-Leu-ONSu	83,0	48	Boc-Thr(Bzl)-ONSu	65,9	—
Boc-Val-ONSu	83,5	74	Z-Ala-ONSu	68,0	65
Boc-Phe-ONSu	68,5	81	Z-Leu-ONSu	73,0	51
Boc-Pro-ONSu	74,0	74	Z-Asp(OBu ^t)-ONSu	76,0	—
Boc-Ile-ONSu	75,0	61	Z-Lys(Boc)-ONSu	72,0	—

новым ангидридом) отечественного производства. Полиакриловую кислоту получали по методике [8], сополимер винилпирролидона с малеиновым ангидридом — по [9]. Растворители очищали по методикам [10]. Температуры плавления определяли на приборе «Воëtius» (ГДР), ИК-спектры снимали на приборе «Hitachi 260-10» (Япония).

Характеристики синтезированных N-оксисукцинимидных эфиров приведены в табл. 1–3.

N-Трифторацетоксисукцинимид. 2,0 г (17,4 ммоль) HONSu растворяли в 5,5 г (26,0 ммоль) трифторуксусного ангидрида и через 15 мин полученный раствор упаривали досуха, промывали гексаном, растворитель декантировали, остаток высушивали в вакууме. Выход 3,6 г (98,4%), т. пл. 60–62° С, лит. т. пл. 60–62° С [3].

N-Оксисукцинимидный эфир полиакриловой кислоты. К суспензии 0,35 г полиакриловой кислоты, содержащей 4,9 ммоль карбоксильных

групп, и 3,4 мл пиридина в 10 мл DMF прибавляли 2,2 г (10,5 ммоль) TFS. Полученный через 20 мин прозрачный раствор выдерживали при 20°С 1 ч и выливали в 200 мл изопропанола. Осадок отфильтровывали и промывали изопропанолом, этилацетатом, эфиром и высушивали в вакууме. Выход 0,8 г (97,6%). ИК-спектр в вазелиновом масле, см⁻¹: 1820, 1780, 1740.

N-Оксисукуцинимидный эфир сополимера винилпирролидона с малеиновым ангидридом, модифицированного Аса. К суспензии 0,9 г полимера, содержащего 2,7 ммоль Аса, и 0,9 мл пиридина в 20 мл DMF прибавляли 1,53 г (7,25 ммоль) TFS. Полученный через 5 мин прозрачный раствор выдерживали 1 ч при 20°С и реакционную массу выливали в 300 мл изопропанола. Осадок отфильтровывали, промывали гексаном и высушивали в вакууме. Выход 1,13 г (97,5%). ИК-спектр в вазелиновом масле, см⁻¹: 1805, 1775, 1730, 1680, 1540, 1205.

N-Оксисукуцинимидный эфир стиромалея, модифицированного Аса. К суспензии 2,0 г стиромалея, содержащего 4,6 ммоль Аса, и 4 мл пиридина в 10 мл DMF прибавляли 4,22 г (20,0 ммоль) TFS и выдерживали 1 ч при 20°С. Полимер отделяли, промывали DMF, ацетоном, этанолом, эфиром (2×10 мл) и высушивали в вакууме. Выход 2,65 г (97%).

N-Оксисукуцинимидный эфир сукцинизированного BSA. К суспензии 0,52 г сукцинизированного BSA в 10 мл DMF прибавляли 1 мл пиридина и 1,06 г TFS. Реакционную массу выдерживали 20 мин при 20°С до полного растворения осадка и при интенсивном перемешивании выливали в 250 мл изопропанола. Осадок отделяли центрифугированием (4000 об/мин), промывали изопропанолом, эфиром и высушивали в вакууме. Выход 0,55 г. ИК-спектр в вазелиновом масле, см⁻¹: 1810, 1780, 1740.

N-Оксисукуцинимидный эфир пальмитиновой кислоты. К раствору 12,82 г (50,0 ммоль) пальмитиновой кислоты в 50 мл хлористого метилена прибавляли 6,0 мл пиридина и 11,54 г (54,1 ммоль) TFS и перемешивали 40 мин при 20°С. Растворитель упаривали, остаток промывали на фильтре водой, 5% водным раствором NaHCO₃, водой, этанолом и высушивали в вакууме.

Бис-N-оксисукуцинимидный эфир глутаровой кислоты. Раствор 2,64 г (20,0 ммоль) глутаровой кислоты и 5,4 мл пиридина в 20 мл хлористого метилена смешивали с 8,68 г (44,0 ммоль) TFS и выдерживали 30 мин при 20°С. Реакционную смесь упаривали и к остатку прибавляли 100 мл изопропанола. Осадок отфильтровывали, промывали изопропанолом и серным эфиром и высушивали в вакууме. ИК-спектр в вазелиновом масле, см⁻¹: 1820, 1780, 1730.

N-Оксисукуцинимидные эфиры *N*-защищенных аминокислот. К раствору 10 ммоль *N*-защищенной аминокислоты и 12–30 ммоль пиридина в 10 мл этилацетата (хлористого метилена) прибавляли при перемешивании 11,0 ммоль TFS. Смесь выдерживали 30 мин при 20°С, разбавляли этилацетатом до 50 мл, промывали водой (3×10 мл), 5% водным раствором NaHCO₃ (3×10 мл) и насыщенным водным раствором NaCl. Этилацетатный слой сушили над безводным Na₂SO₄, упаривали и кристаллизовали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Briand J. P., Müller S., Van Regenmortel M. H. V. J. Immunol. Methods, 1985, v. 78, № 1, p. 59–69.
2. Sakakibara S., Inukai N. Bull. Chem. Soc. Jap., 1965, v. 38, № 11, p. 1979–1984.
3. Андреев С. М., Павлова Л. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1980, № 5, с. 1078–1081.
4. Бодамский М., Лауэнер Я. С. В кн.: Химия полипептидов/Ред. Катсоянвс П. М.: Мир, 1977, с. 47.
5. Miron T., Wilchek M. Anal. Biochem., 1982, v. 126, № 2, p. 433–435.
6. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, p. 1839–1842.
7. Боданский М. В кн.: Пептиды. Основные методы образования пептидных связей/Ред. Гросс Э., Майенхофер И. М.: Мир, 1983, с. 152.
8. Houben-Weyl – Müller Methoden der Organischen Chemie. Stuttgart, 1961, Bd XIV/I, S. 1010.

9. Самойлова П. А., Андреев С. М., Галкин О. М., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1627-1637.
10. Гордон Л., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976, с. 437.
11. Raquet A. Can. J. Chem., 1979, v. 57, № 20, p. 2775-2778.
12. Pilch P., Czech M. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 3375-3381.

Поступила в редакцию
24.VII.1986

SYNTHESIS OF N-HYDROXSUCCINIMIDE ESTERS OF CARBOXYLIC POLYMERS AND ORGANIC ACIDS USING N-TRIFLUOROACETHOXSUCCINIMIDE

ANDREEV S. M., SIDOROVA M. V., RAKOVA O. A., TSVETKOV D. E.,
FONINA L. A.

Institute of Immunology, Health Ministry of the USSR, Moscow

A method for preparation of N-hydroxysuccinimide esters of carboxylic polymers and organic acids with a transesterification reagent, N-trifluoroacethoxysuccinimide, is reported. The esterification is carried out in aprotic solvents in the presence of pyridine for 20-60 min at 20°C. The method was used for activation of the following compounds: polyacrylic acid, copolymer of vinylpyrrolidone with maleic anhydride and copolymer of styrene with maleic anhydride containing residues of ϵ -aminocaproic acid, BSA, fatty acids, dicarboxylic acids, Boc- and Z-amino acids.