



УДК 547.479.6.466 : 543.544

ПОЛИМЕРНЫЙ СУКЦИНИМИДОТЕТРАФТОРФЕНОЛ ДЛЯ ПЕПТИДНОГО СИНТЕЗА

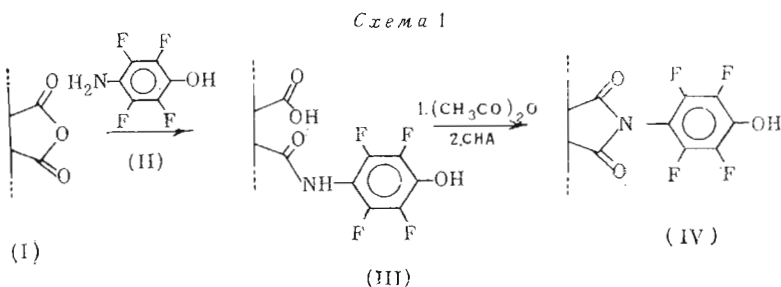
Самойлова Н. А., Волконский А. Ю., Рогожин С. В.

*Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР,
Москва*

Показана принципиальная возможность получения фторфенольного полимера — активатора карбоксильных групп аминокислот и пептидов. С этой целью 4-амино-2,3,5,6-тетрафторфенол вводили в реакцию со шитым сополимером малеинового ангидрида со стиролом. После циклизации полученного амида в имид и блокирования непрореагировавших ангидридных звеньев содержание активирующих групп в полимере составляло 0,2–0,3 ммоль на 1 г полимера. Синтез низкомолекулярного аналога из янтарного ангидрида проходил с выходом 20–25%. Методом количественной ТСХ исследована кинетика аминолиза с помощью $N\text{-Ser}(\text{O}Bu^t)\text{O}Bu^t$ полученных DCC-методом полимерных сукцинимидотетрафторфенолиловых эфиров Woc-Gly и Woc-Ala для степеней конверсии аминокомпонента 10–90%.

Использование полимеров в качестве активаторов карбоксильных групп аминокислот и пептидов в пептидном синтезе [1] по сравнению с классическими методами образования пептидной связи имеет некоторые преимущества: более высокий выход и чистоту синтезируемых продуктов. Полимер-активатор легко регенерируется и может быть использован многократно. В качестве таких полимеров применяли преимущественно высокомолекулярные производные гидроксиламина [2–4], N -гидроксибензотриазола [5], а также полимерные нитрофенолы [6–8]. До настоящего времени в литературе не описан синтез и использование для получения пептидов полимерных реагентов на основе галофенолов, хотя соответствующие низкомолекулярные аналоги отличаются высокой реакционной способностью [9, 10].

Нами синтезирован полимерный сукцинимидотетрафторфенол (схема 1) путем введения активирующей группировки в нерастворимый полимер-носитель — шитый сферически гранулированный сополимер малеинового ангидрида со стиролом со строго чередующимися мономерными звеньями (I). Этот сополимер ранее использовался нами для получения поли- N -гидрокси-сукцинимидов [3].



Перфторированный аминофенол (II) получали, исходя из пентафторнитробензола, путем омыления до 4-нитро-2,3,5,6-тетрафторфенола [11] с последующим восстановлением нитрогруппы по методу [12].

Введение лиганда (II), взятого в 1,3–1,5-кратном мольном избытке, в полимерный ангидрид осуществляли в среде пиридина при 65–70° С в течение 4 ч. Реакция сопровождалась фиолетовым окрашиванием реакционной смеси. Аналогичное явление наблюдали и при синтезе модель-

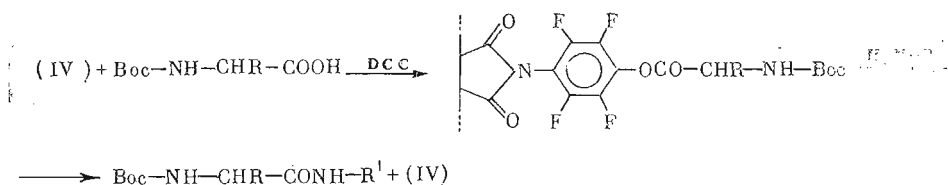
ного соединения из янтарного ангидрида и 4-амино-2,3,5,6-тетрафторфенола. Искомый кристаллический амид в последнем случае удалось выделить с выходом 20–25%. По-видимому, перфторированный *n*-аминофенол участвовал в побочных реакциях окисления; выход продукта не удалось существенно повысить и при проведении этой реакции в атмосфере инертного газа. Наличие такого побочного процесса в совокупности с пониженной реакционной способностью аминогруппы фенола (II), а также олеофобностью лиганда приводило к получению полимера-активатора с относительно невысоким содержанием активирующей группировки (0,2–0,3 ммоль/г носителя). В настоящей работе авторы не ставили своей целью оптимизации процесса получения полимерного галогенфенола.

Соединение (III) циклизовали в имид (IV) при комнатной температуре с помощью уксусного ангидрида. Синтез низкомолекулярного *n*-сукцинимидотетрафторфенола проходил с хорошим выходом с использованием как уксусного, так и трифторуксусного ангидрида. Немодифицированные *n*-аминофторфенолом (II) остатки маленинового ангидрида блокировались путем двукратного воздействия избытком циклогексилламина (СНА) на полимер, предварительно обработанный уксусным ангидридом.

Реакционная емкость синтезированного таким образом высокомолекулярного активатора (IV) соответствовала расчетной. Она определялась по методике [13] исходя из выхода циклогексилламида, получаемого действием избытка СНА на предварительно ацелированный полисукцинимидотетрафторфенол.

Применение полученного полимерного сукцинимидотетрафторфенола (IV) в синтезе пептидов иллюстрируется схемой 2. Стадию активации *N*-защитной аминокислоты проводили ДСС-методом, используя 5–10-кратные избытки активируемого компонента — Woc-Ala-OH и Woc-Gly-OH — при 0°С. Синтезированные полимерные реагенты хорошо набухали в DMF, пиридине, тетрагидрофуране, хлористом метилселе, обладали высокой механической прочностью.

Схема 2



Полимерные активированные эфиры вводили в реакцию амилолиза с $\text{H-Ser}(\text{OBu}^t)\text{OBu}^t$ или СНА в системе DMF — пиридин. За ходом реакции следили с помощью количественной ТСХ, отбирая во времени пробы надосадочной жидкости (по 1 мкл). На рисунке представлены типичные кривые изменения концентраций аминокомпонента и продукта реакции, рассчитанные в присутствии соответствующих стандартов после деситометрического анализа нингидрин-положительных пятен. Нами был также оценен возможный вклад сорбции в изменение концентрации каждого из аминокомпонентов в растворе в присутствии полимера-активатора, и было установлено, что при соотношениях, аналогичных используемым в амилолизе, она не наблюдалась.

В ходе исследования взаимодействия СНА с ацелированным полимером, взятым в 10-кратном мольном избытке, уже через 1 мин. по данным ТСХ, в реакционной смеси не обнаруживали аминокомпонента. Учитывая невысокую реакционную емкость полимера-активатора, оценивали вероятность участия в амилолизе полимерных смешанных ангидридов карбоксиллов матрицы с карбоксильным компонентом. Такие аддукты теоретически могли образовываться в процессе активации, если часть карбоксильных групп в цепи полимера оставалась незамещенной. Для этого исходный полимер-носитель проводили через все вышеуказанные стадии: «ангидридации», введения остатков СНА, активации карбоксильного

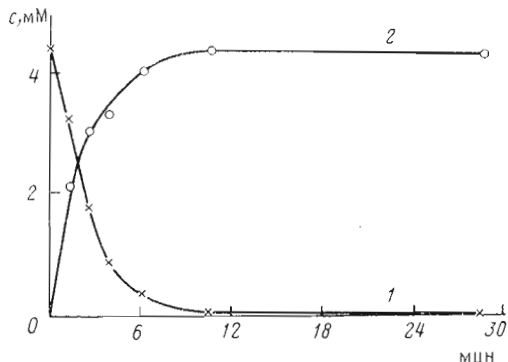
компонента и амиолиза. В результате на последней стадии аминокомпонент не расходовался.

Анализ скоростей реакций синтеза двух дипептидов методом сукцинимидофторфениловых эфиров приведен в таблице. Выявленная нестабильность кинетических констант во времени отражала специфику гетерофазной реакции амиолиза. Вначале скорость реакции была еще недостаточно высока, так как происходило смачивание и набухание полимера. Затем количество вовлекаемых в амиолиз реакционных центров возрастало — скорость увеличивалась. В данном случае в условиях 10-кратного избытка полимерного реагента не было обнаружено снижения значений констант скоростей к концу реакций в отличие от амиолиза с участием поли-N-оксисукцинимидных эфиров [14, 15]. По-видимому, это связано с большей реакционной способностью и большей доступностью реакционных групп полисукцинимидофторфениловых эфиров. Порядок величин полученных констант скорости второго порядка близок к аналогичным для амиолиза с помощью низкомолекулярных пентафторфениловых эфиров. Так, для пептида Boc-Gly-Ser(OBzl)OMe это значение составляло $80 \pm 7,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ в DMF [16] и $19,3 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ (или $11,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) — для Z-Ala-Val-OMe в среде тетрагидрофурана в присутствии триэтиламина [17]. По окончании амиолиза полимер-активатор регенерировали обработкой СНА с последующей отмывкой органическими растворителями, водной кислотой. Свойства полисукцинимидотетрафторфенола при этом не менялись (содержание фтора в образцах полимера оставалось постоянным).

Таким образом, в настоящей работе показана принципиальная возможность получения полимерных галогенфенолов — активаторов карбоксильных групп аминокислот и пептидов.

Кинетические параметры реакций амиолиза H-Ser(OBu^t)OBu^t полимерных сукцинимидотетрафторфениловых эфиров Boc-Gly и Boc-Ala в среде DMF — пиридин (4 : 1)

Начальная концентрация аминокомпонента $4,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, концентрации полимерных активированных эфиров: Boc-Gly — $4,4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, Boc-Ala — $3,55 \cdot 10^{-2} \text{ M}$



Амиолиз полимерного сукцинимидотетрафторфенилового эфира Boc-Ala с помощью H-Ser(OBu^t)OBu^t в системе DMF — пиридин (4 : 1): 1 — изменение концентрации H-Ser(OBu^t)OBu^t; 2 — изменение концентрации Boc-Ala-Ser(OBu^t)OBu^t

Синтезируемый пептид	Время реакции, мин	Степень конверсии H-Ser(OBu ^t) × OBu ^t , %	Константы скорости реакции *	
			k, мин ⁻¹	k', M ⁻¹ ·мин ⁻¹
Boc-Gly-Ser(OBu ^t)OBu ^t	0,15	10	0,87±0,17	15,1±1,4
	0,4	30	1,10±0,20	20,8±1,5
	0,75	50	1,03±0,12	21,5±0,9
	1,2	70	1,09±0,10	23,6±0,7
	2,15	90	1,08±0,01	25,9±0,1
Boc-Ala-Ser(OBu ^t)OBu ^t	0,4	10	0,29±0,02	8,4±0,4
	1,2	30	0,34±0,03	8,8±0,5
	2,0	50	0,38±0,03	10,3±0,5
	3,2	70	0,39±0,02	11,0±0,4
	5,7	90	0,40±0,01	12,3±0,2

* k и k' — константы скорости первого и второго порядка.

Экспериментальная часть

DMF, пиридин очищали по методике [18]. Янтарный ангидрид (марки ч.д.а.) использовали без дополнительной очистки. Сшитый 8 мол.% 4,4'-диаминодифенилоксида сополимер малеинового ангидрида со стиролом (диаметр сферических гранул 0,1–0,3 мм; содержание ангидридных групп 3,0 ммоль/г полимера) получали по методике [3]. Использовались ДСС и нингидрин (Merck, ФРГ), производные аминокислот (Reanal, Венгрия). Дипептид Boc-Ala-Ser(OBu^t)Bu^t, применявшийся в качестве стандарта, любезно предоставлен О. А. Раковой.

Температуры плавления, определенные на приборе Кофлера (ГДР), приведены без исправления. ИК-спектры* (KBr) снимали на приборе UR-20 (ГДР), спектры ЯМР — на спектрометрах Tesla BS 467 A (ЧССР) (¹H, 60 МГц) и Bruker WP-200 SY (ФРГ) (¹⁹F, 188,3 МГц). Химические сдвиги приведены от внешних эталонов — Me₄Si (¹H), в δ-шкале, и CF₃COOH (¹⁹F). Масс-спектры снимали на приборе VG 7070 E (Англия) при 70 эВ.

Количественную ТСХ проводили на пластинках (10×20 см) с кизельгелем 60 (Merck, ФРГ) в системе растворителей *n*-бутанол — CH₃COOH — H₂O, 4 : 1 : 1 (А). Денситометрирование пластинок после обработки нингидрином (70° С, 0,5 ч) проводилось с помощью скапирующей приставки к спектрофотометру Hitachi-557 (Япония) методом отражения в двухволновом режиме: λ₁ 570, λ₂ 620 нм (щель 0,2×6 мм). Хроматографические подвижности определяли в системе А, а также в системе изопропанол — конц. NH₄OH, 7 : 3 (Б); в качестве проявляющего вещества использовали также I₂.

4-Амино-2,3,5,6-тетрафторфенол (II) получали по методике [12] из 4-нитро-2,3,5,6-тетрафторфенола, который в свою очередь синтезировали согласно работе [11] из пентафторнитробензола. Соединение (II) получено в виде бесцветных кристаллов, т. пл. 174–175° С (180° С [12]). Спектр ¹⁹F-ЯМР (этанол): +86,5 м (2F), +87,4 м (2F). Масс-спектр (приведены *m/z*, интенсивность в %, предполагаемое отнесение): 181,100, M⁺; 180, 21,8 (M–H)⁺; 179, 10,9 (M–2H)⁺; 152, 4,5 (M–CHO)⁺; 149, 41,8 (M–CHF)⁺; 133, 36,4 (M–CO–HF)⁺; 106, 49,0 (C₂HF₃)⁺; 57, 72,7 (C₂H₃NO⁺ и/или C₃H₂F⁺). ИК-спектр (ν, см⁻¹): 1515 пл, 1520 с, 1540 с, 1610 ср (фторароматическое ядро), 3315 с, 3405 с, 2200–3650 ш, ср (NH₂, OH).

Синтез полимерного сукцинимидотетрафторфенола (IV). Суспензию 0,96 г (2,9 ммоль) сшитого сополимера малеинового ангидрида со стиролом (I) в растворе 0,80 г (4,4 ммоль) 4-амино-2,3,5,6-тетрафторфенола (II) в 3,5 мл сухого пиридина перемешивали 4 ч при 65–70° С. Реакционная смесь приобретала фиолетовую окраску. Полимер отфильтровывали, промывали DMF, водой, 0,6 М HCl, водой, ацетоном. После этого дважды осуществляли следующую процедуру: выдерживали полимер 5 ч в 4 мл смеси ацетон — укусный ангидрид (1 : 1), отмывали ацетоном, DMF, выдерживали 0,5 ч в 1 мл СНА и 3 мл DMF, промывали DMF, ацетоном, водой, 0,6 М HCl, водой, ацетоном, эфиром. Высушивали в вакууме. Выход 1,20 г (желтоватые гранулы). Найдено, %: F 1,82. ИК-спектр (ν, см⁻¹): 1710 ср, 1780 с (CONCO). Содержание сукцинимидотетрафторфенольных групп 0,216 ммоль/г полимера (срделено по методике [13]).

Модельная реакция янтарного ангидрида с 4-амино-2,3,5,6-тетрафторфенолом. 0,84 г (8,32 ммоль) янтарного ангидрида и 2,0 г (10,04 ммоль) 4-амино-2,3,5,6-тетрафторфенола (II) растворяли в 12 мл сухого дезаэрированного пиридина, раствор нагревали 4 ч при 75° С. Раствор приобретал фиолетовую окраску. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в этаноле (3 мл), осаждали эфиром темно-фиолетовый замасливающийся осадок. Эфирный слой декантировали, упаривали, затем экстрагировали 50 мл эфира. Упаривали до объема 10 мл, из раствора на холоду (4° С) выпадали светло-фиолетовые кристаллы, которые отфильтровывали. ¹⁹F-

* Сокращения: с — сильная, ср — средней интенсивности, сл — слабая, ос — очень сильная, ш — широкая, пл — плечо.

ЯМР-спектр (сырой продукт, этанол): +71,4 м (2F; F3, F5); +86,9 м (2,8F; F2, F6). Кристаллизовали дважды из системы ацетон — гептан. Выход 0,59 г (25%). R_f 0,75 (А), 0,35 (Б). Т. пл. 179—180° С. ИК-спектр (ν , см⁻¹): 1260 сл, 1535 с, 1680 с (CONH). Найдено, %: С 44,0; Н 2,71; N 5,10; F 24,7. C₁₀H₇F₄NO₄. Вычислено, %: С 42,7; Н 2,51; N 4,98; F 27,0.

n-Сукцинимидотетрафторфенол. 0,10 г (0,36 ммоль) вышеполученного *n*-окситетрафторфениламида янтарной кислоты растворяли в 0,5 мл (CF₃CO)₂O, через 3 ч раствор упаривали, к остатку прибавляли 2 мл эфира. Образовавшиеся кристаллы трифторацетильного производного отфильтровывали, промывали эфиром. Выход 0,085 г (66%). ¹⁹F-ЯМР-спектр (сырой продукт, этанол): -1,1 с (3F, CF₃); +70,4 м (2F, F3, F5); +86,9 м (2F, F2, F6); незначительные примеси -2 с; -3,1 с. Кристаллизовали из системы ацетон — эфир. Т. пл. 152—162° С. ИК-спектр (ν , см⁻¹): 1730 с шир, 1780 с (CONCO), 1810 с (CF₃COO). Трифторацетат суспендировали в воде, через 3 ч отфильтровывали, высушивали. Выход ~100%. ИК-спектр (ν , см⁻¹): 1730, 1780. Т. пл. 183—185° С (бесцветные иглы). R_f 0,68 (Б).

Аналогично *n*-сукцинимидотетрафторфенол был получен и при циклизации с использованием (CH₃CO)₂O.

Полимерные сукцинимидотетрафторфениловые эфиры N-защищенных аминокислот (типичная методика). К суспензии 1,16 г (0,23 ммоль) полимера (IV) в растворе 0,35 г (2,0 ммоль) Вос-Gly-OH в 4 мл DMF, охлажденном до 0° С, добавляли 0,62 г (3,0 ммоль) DCC и реакционную смесь перемешивали 12 ч при 0° С. Полимер отфильтровывали, промывали метанолом, эфиром и сушили в вакууме. Выход полимерного эфира 0,20 г (~100%). Содержание аминокислоты 0,20 ммоль/г полимера.

Синтез пептидов (типичная методика). К раствору 0,0056 г (0,022 ммоль) HCl·H-Ser(OBu')OBu' в 4 мл DMF и 1 мл пиридина прибавляли 0,80 г (0,18 ммоль) полимерного сукцинимидотетрафторфенилового эфира Вос-Ala-OH. Время добавления полимера — начало отсчета времени реакции. Реакционную смесь перемешивали, отбирая во времени пробы надосадочной жидкости по 1 мкл для ТСХ. R_f H-Ser(OBu')OBu' 0,71 (А), Вос-Ala-Ser(OBu')OBu' 0,91 (А). Денситометрический анализ полученных хроматограмм проводили в присутствии соответствующих стандартов (на пластинку наносили по 4 мкмоль вещества). Изменения концентраций растворимых компонентов реакционной смеси представлены на рисунке, кинетические параметры реакций синтеза двух дипептидов — в таблице.

ЛИТЕРАТУРА

1. Patchornik A., Cohen B. J. // Perspectives in Peptide Chemistry. Basel: S. Karger, 1981. P. 118—128.
2. Fridkin M., Patchornik A., Katchalski E. // Biochemistry. 1972. V. 11. № 3. P. 466—474.
3. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Юрганов А. И. // Докл. АН СССР. 1973. Т. 241. С. 1356—1358.
4. Самойлова Н. А., Андреев С. М., Галкин О. М., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. // Биоорганич. химия. 1981. Т. 7. № 11. С. 1627—1637.
5. Mokotoff M., Patchornik A. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1983. V. 21. № 2. P. 145—154.
6. Kalir R., Fridkin M., Patchornik A. // Eur. J. Biochem. 1974. V. 42. № 1. P. 151—156.
7. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Мрачковская Т. А. // Биоорганич. химия. 1978. Т. 4. № 5. С. 599—603.
8. Cohen B. J., Karoly-Hajeli H., Patchornik A. // J. Org. Chem. 1984. V. 49. № 5. P. 922—924.
9. Pless J., Boissonnas R. A. // Helv. chim. acta. 1963. V. 46. № 5. P. 1609—1625.
10. Kovacs J., Cover R. E., Johnson R. H., Kalas T. J., Mayers G. L., Roberts J. E. // J. Org. Chem. 1973. V. 38. № 14. P. 2518—2524.
11. Якобсон Г. Г., Корбина Л. С., Фурии Г. Г. Способ получения пара- и орто-нитротетрафторфенолов. А. с. 225 210 СССР // Б. И. 1968. № 27.
12. Birchall J. M., Haszeldine R. N., Kokavouras J. N., Wilks E. S. // J. Chem. Soc. (C). 1971. № 3. P. 562—566.
13. Akyama M., Yanagisawa J., Okawara M. // J. Polym. Sci. 1969. V. 7A—1. № 7. P. 1905—1912.
14. Gut V., Davidovich Yu. A. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1976. V. 41. № 3. P. 780—784.
15. Самойлова Н. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 3. С. 358—364.

16. Гурин С. К., Швачкин Ю. П. // Журн. общей химии. 1979. Т. 49. № 2. С. 451–457.
17. Kovacs J., Davis E. J., Johnson R. H., Cortegiano H., Roberts J. E. // Chemistry and Biology of Peptides./Ed. Meienhofer J. Ann. Arbor. Sci. Publ., 1972. P. 359–364.
18. Бекер Г., Бергер В. и др. // Органикум. Т. 2. М.: Мир, 1979.

Поступила в редакцию
20.VI.1988

POLYMERIC SUCCINIMIDO-TETRAFLUOROPHENOL FOR PEPTIDE SYNTHESIS

SAMOILOVA N. A., VOLKONSKY A. Yu., ROGOZHIN S. V.

*A. N. Nesmeyanov Institute of Organo-Element Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A polymeric reagent for activation of carboxyl groups in peptide synthesis, poly-*p*-succinimido-tetrafluorophenol, has been obtained by treating insoluble styrene-maleic anhydride copolymer with 4-amino-2,3,5,6-tetrafluorophenol followed by transformation of amino into imido groups and blocking of unreacted maleic anhydride residues with cyclohexylamine. The polymer contained 0,2–0,3 mmole of active groups per gram. Monomeric *p*-succinimido-tetrafluorophenol was also obtained with a 20 to 25% yield. Kinetics of aminolysis of some polytetrafluorophenolic esters of N-protected amino acids by a C-protected serine were investigated.