



УДК 547.466:542.95

ПРИСОЕДИНЕНИЕ ТРЕТ-БУТИЛОКСИКАРБОНИЛАМИНОКИСЛОТ  
К ХЛОРМЕТИЛИРОВАННОМУ СОПОЛИМЕРУ СТИРОЛА  
С ДИВИНИЛБЕНЗОМ В УСЛОВИЯХ МЕЖФАЗНОГО КАТАЛИЗА

*Куликов С. В., Соколова Н. Ю., Леонова Е. Б.,  
Самарцев М. А.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт  
особо чистых биопрепаратов, Ленинград*

Этерификация полимера Меррифилда солями Вос-аминокислот в присутствии четвертичных оснований, например тетрабутиламмонийбромид, позволяет повысить выходы аминоацилированного полимера при повышенной температуре реакции и уменьшенном расходе Вос-аминокислоты. Особенно существенный эффект достигается в случае трифункциональных аминокислот — глутамина, серина, треонина, цистеина, аспарагиновой кислоты, аспарагина и аргинина. При этом в большинстве случаев цезиевым солям алциламиноакислот можно предпочесть калиевые соли.

С момента введения твердофазного метода в практику пептидного синтеза [1] осуществляется поиск условий присоединения первой аминокислоты к хлорметилованному сополимеру стирола с дивинилбензолом [1—12]. Первоначально предложенный Меррифилдом метод, основанный на использовании в качестве основания триэтиламина [1], не оправдал себя из-за образования на полимере четвертичных аммониевых групп, что может приводить к формированию укороченных последовательностей [2, 3]. В дальнейшем был опробован ряд методов, в которых использовались дидиклогексиламмониевые [4], натриевые [5], калиевые [6], тетраметиламмониевые [2, 7] и другие соли [8] аминокислот и пептидов.

В настоящее время наиболее распространен метод Гизина [9] — использование цезиевых солей Вос-аминокислот в диметилформамиде при 50° С. Практическое осуществление этой методики требует применения 2—6-кратных избытков цезиевой соли [10]. В ряде работ отмечается неудовлетворительное присоединение некоторых, особенно трифункциональных, аминокислот в условиях метода Гизина, например Вос-Тур(Вzl)-ОН (20—30%) [11], Вос-Arg(Tos)-ОН [12], Вос-Asn-ОН [13] и др. Для повышения нагрузки полимера было предложено проводить реакцию в присутствии краун-эфира [14] или фторида калия [15].

В ходе работы мы столкнулись с необходимостью получения пептидов с С-концевыми аргинином, аспарагином и цистеином. При применении метода Гизина [9] степень замещения галогена полимера этими аминокислотами не превышала 20%. Даже использование 3-кратного избытка цезиевой соли Вос-нитроаргинина привело к замещению лишь 40% хлора.

В работе [14] отмечалось, что в присутствии краун-эфира калиевые соли ряда Вос-аминокислот при комнатной температуре за 18 ч практически полностью замещают галоген в хлорметилованном полимере. Действительно, в наших опытах производные бифункциональных аминокислот в этих условиях замещают более 80% хлора. Наличие краун-эфира при взаимодействии калиевых солей N-защищенных аспарагина, N<sup>G</sup>-нитроаргинина и S-ацетамидометилцистеина с полимером Меррифилда в течение 48 ч также привело к повышению выхода аминоацилированного полимера, однако не более чем до 45% (табл. 1). Совокупность полученных

Сокращения: СТАВ — цетилтретаммонийбромид, ТВАВ — тетрабутиламмонийбромид, ТВРВ — тетрабутилфосфонийбромид, DMF — диметилформамид.

Взаимодействие калиевых солей Вос-аминокислот с хлорметилированным сополимером стирола с дивинилбензолом в присутствии 18-краун-6\*

Вос-Аминокислота	Степень замещения, %		Вос-Аминокислота	Степень замещения, %	
	Без катализатора	В присутствии 18-краун-6		Без катализатора	В присутствии 18-краун-6
Gly	46	82	Asn	4	30
Ile	37	89	Arg(NO <sub>2</sub> )	2	44
Leu	20	76	Cys(Acm)	7	36
Asp(OBzl)	15	67			

\* Здесь и далее содержание активного хлора в полимере 0,54 ммоль/г (реакция в DMF, 48 ч). Соотношение аминокислота — полимер — катализатор 1,2 : 1 : 1,2, температура 20° С.

нами и литературных [11—13] данных позволяет отнести эти трифункциональные аминокислоты к разряду «трудных», условия присоединения которых к полимеру Меррифилда требуют дополнительного изучения.

Применение краун-эфиров можно рассматривать как частный случай использования межфазного катализа [16]. Большое распространение в качестве катализаторов межфазного переноса получили четвертичные ониевые соли. Например, в химии полимеров используется этерификация полихлорметилстирола уксусной, тиоуксусной и бензойной кислотами в виде калиевых или натриевых солей [17], модификация шитых хлорметилированных стирольных полимеров бутандитиолом [18] и азидом натрия [19]. Полагают, что механизм катализа взаимодействия нерастворимого полимера с растворимой солью заключается в создании высокой локальной концентрации аниона-нуклеофила на поверхности полимера за счет сорбции четвертичной соли с последующей сорбцией аниона [19]. Это явление более подробно изучено применительно к процессам ион-парной хроматографии на гидрофобных сорбентах в присутствии ПАВ [20, 21], причем механизмы удерживания при использовании четвертичной соли [20] и краун-эфира [21] различны. Возможно, что механизм каталитического действия краун-эфира в реакции присоединения ациламинокислоты также будет отличаться от механизма действия четвертичных ониевых солей.

В данной работе изучено влияние бромидов цетилтриметиламмония, тетрабутиламмония и тетрабутилфосфония на реакцию этерификации полимера Меррифилда солями Вос-аминокислот.

В качестве модельной системы для сравнения трех катализаторов и подбора их концентрации использовали реакцию полимера с Вос-изолейцином в виде натриевой, калиевой или цезиевой соли. Было найдено, что при присоединении солей Вос-аминокислот к хлорметилированному полимеру необходимо присутствие эквимольного нуклеофила количества катализатора, что может служить косвенным подтверждением механизма межфазного катализа, предложенного в работе [19].

Сравнение эффективностей этерификации хлорметилированного полимера различными солями Вос-изолейцина подтвердило известные данные [9, 17] о том, что натриевые соли наименее активны при присоединении карбоновых кислот к полимерам в отсутствие катализатора (табл. 2). Сопоставление четвертичных солей в реакции этерификации полимера Меррифилда производными бифункциональных аминокислот показало, что ТВАВ и ТВРВ значительно более эффективны, чем СТАВ (табл. 2). В то же время ТВРВ заметно уступал ТВАВ при проведении реакции с солями трифункциональных аминокислот, таких, как Вос-аспарагин и Вос-глутамин: выходы в присутствии ТВАВ были более чем в 2 раза выше. Таким образом, ТВАВ может рассматриваться как оптимальный из испытанных катализаторов. В его присутствии реакция натриевой соли Вос-изолейцина с хлорметилполимером при их соотношении 2 : 1 за 48 ч при комнатной температуре проходит с выходом до 70%, что соответству-

Таблица 2

Влияние четвертичных аммониевых солей и температуры реакции на степень замещения хлора (в процентах) в хрометилированном сополимере стирола с дивинилбензолом в реакции с солями Вос-изолейцина при соотношении аминокислота — активный хлор 1:1 и 2:1 моль/г-атом \*

Соль	Без катализатора **		1:1					2:1			
	А	Б	СТАВ		ТВАВ		ТВРВ	СТАВ		ТВАВ	ТВРВ
			А	Б	А	Б	А	А	Б	А	А
Na	9	42	32	45	44	70	43	45	47	70	67
K	37	66	41	58	93	—	87	46	65	93	85
Cs	42	56	45	63	67	76	85	61	63	85	91

\* Количество катализатора и аминокислоты эквивалентно, температура 20 (А) и 50° С (Б).  
Остальные условия — см. примечание к табл. 1.

\*\* 2 моль соли на 1 г-атом хлора.

Таблица 3

Степень замещения (%) активного хлора при взаимодействии натриевых солей Вос-аминокислот с хрометилированным сополимером стирола с дивинилбензолом \*

Вос-Аминокислота	Без катализатора **		ТВАВ	
	20° С	50° С	20° С	50° С
Ile	9 *	42 *	44	70
Ile	—	—	60 ***	79 ***
Gly	9	28	65	83
Leu	7	19	54	76
Asp (OBzl)	7	31	44	55
Asn	6	20	20	59
Arg (NO <sub>2</sub> )	6	35	28	52

\* Соотношение аминокислота — ТВАВ — активный хлор 1,2 : 1,2 : 1 (48 ч).

\*\* 2 моль соли на 1 г-атом хлора.

\*\*\* Время реакции 72 ч.

ет результату, полученному при применении 3-кратного избытка цезиевой соли без катализатора при 50°С (62%). Увеличение продолжительности реакции позволяет дополнительно повысить степень замещения галогена в полимере Меррифилда, что делает даже натриевые соли вполне пригодными для присоединения Вос-аминокислот к хлорметилполимеру (табл. 2, 3).

В отсутствие катализатора для достижения достаточно высокого выхода замещения хлора цезиевыми солями ациламино кислот необходимо проводить реакцию при повышенной температуре (табл. 4). Исключение составляют Вос-пролин и Вос-О-бензилтреонин, для которых выходы при 20 и 50°С различаются незначительно. Включение в реакционную смесь ТВАВ позволяет во многих случаях проводить реакции с меньшим выходом уже при комнатной температуре, причем образующиеся аминокислотные полимеры по содержанию аминокислоты не уступают полимерам, полученным по методу Гизина [9]. Например, нагрузка полимера Вос-глицином в условиях работы [9] за 24 и 48 ч составляет 61 и 75% соответственно; использование катализатора позволяет повысить выход до 83% при сокращении времени проведения реакции при 50°С до 24 ч.

Особо следует остановиться на присоединении к полимеру Меррифилда производных трифункциональных аминокислот. Такие «трудные» аминокислоты, как Вос-глутамин, N<sup>α</sup>-Вос-S-ацетамидометилцистеин, N<sup>α</sup>-Вос-N<sup>ε</sup>-нитроаргинин и Вос-аспарагин, без катализатора дают крайне низкие вы-

Степень замещения (%) при взаимодействии цезиевых солей Вос-аминокислот с хлорметилированным сополимером стирола с дивинилбензолом \*

Вос-Аминокислота	Количество соли, моль/г-атом хлора	Без катализатора		ТВАВ	
		20° С	50° С	20° С	50° С
Gly **	1,2	—	61	—	83
Gly	1,2	39	75	74	83
Ala	1,2	56	87	89	—
Ala	3,0	—	91	—	—
Pro	1,2	83	91	85	—
Leu	1,2	24	76	78	—
Leu	3,0	—	87	—	—
Val	1,2	65	83	82	—
Thr (Bzl)	1,2	61	59	83	—
Thr (Bzl)	3,0	—	58	—	—
Ser (Bzl)	1,2	37	72	85	—
Ser (Bzl)	3,0	—	76	—	—
Asp (OBzl)	1,2	39	—	70	—
Asp (OBzl)	3,0	—	67	—	—
Asn	1,2	6	13	—	25
Asn	2,0	6	—	35	—
Gln	1,2	—	17	—	69
Gln	2,0	10	—	56	—
Arg (NO <sub>2</sub> )	1,2	6	19	28	83
Arg (NO <sub>2</sub> )	2,0	6	—	31	—
Arg (NO <sub>2</sub> )	3,0	—	43	—	—
Cys (Acm)	1,2	13	41	30	65
Cys (Acm)	3,0	—	44	—	—

\* Условия реакции — см. табл. 1.

\*\* Время реакции 24 ч.

ходы. Добавка ТВАВ позволяет существенно увеличить замещение подвижного галогена этими производными. В случае Вос-глутамина при комнатной температуре достигается емкость 0,3 ммоль/г (56% замещения хлора), что делает этот полимер приемлемым для проведения твердофазного синтеза пептидов с С-концевым глутамином. Для получения удовлетворительной нагрузки полимера N<sup>α</sup>-Вос-N<sup>ε</sup>-нитроаргинином и N<sup>α</sup>-Вос-S-ацетамидометилцистеином в присутствии катализатора необходимо повышение температуры до 50°С. В то же время катализатор слабо влияет на присоединение цезиевой соли Вос-аспарагина.

Известно, что в присутствии краун-эфира калиевые соли Вос-аминокислот активнее других солей вступают в реакцию с хлорметилированным полимером [14]. Применение ТВАВ при присоединении калиевых солей ациламино кислот к полимеру Меррифилда также позволяет существенно повысить нагрузку образующегося полимера. Например, этерификация хлорметилированного полимера калиевой солью Вос-изолейцина в присутствии ТВАВ при комнатной температуре приводит к образцам с содержанием Вос-изолейцина более 90% (табл. 2). Калиевая соль Вос-глицина замещает 82% активного хлора, тогда как использование цезиевой соли дает 74% замещения (табл. 5). При использовании калиевой соли Вос-аспарагина в присутствии ТВАВ при 20°С удалось получить полимер, степень замещения в котором составила 52%. Ни в одном случае замена цезия на калий не приводит к ухудшению нагрузки полимера (табл. 5).

Следовательно, если в отсутствие катализатора наиболее эффективен катион цезия, то в присутствии ТВАВ, как и краун-эфира [14], использование калиевых солей Вос-аминокислот становится предпочтительным, причем по сравнению с краун-эфиром применение ТВАВ в ряде случаев позволяет получать более высокие степени замещения.

Необходимо отметить влияние следов воды на реакцию. Так, если использовать свежеприготовленную, тщательно высушенную цезиевую соль N<sup>α</sup>-Вос-N<sup>ε</sup>-нитроаргинина, степень замещения достигает 0,45 ммоль/г



Сравнение степени замещения (%) при присоединении калиевых и цезиевых солей Вос-аминокислот к хлорметилированному сополимеру стирола с дивинилбензолом \*

Вос-Аминокислота	Катион	Без катализатора	ТВАВ
Gly	Cs	39	74
	K	46	82
Phe	Cs	42	67
	K	37	93
Leu	Cs	24	78
	K	20	78
Asp(OBzl)	Cs	39	70
	K	15	78
Asn	Cs	66	35
	K	4	52
Arg(NO <sub>2</sub> )	Cs	6	28
	K	2	41
Cys(Acm)	Cs	13	43
	K	7	41
Cys(Bzl)	Cs	48	76
	K	31	72
His(Tos)	Cs	30	65
	K	41	83

\* DMF, 48 ч, 20° С, соотношение Вос-аминокислота — ТВАВ — активный хлор 1,2 : 1,2 : 1.

(83%); в случае применения препарата, хранившегося сутки на воздухе, степень замещения составляет 0,14—0,23 ммоль Arg/г. Такое же влияние оказывает избыток карбоната цезия.

Связывание ациламино кислот с полимером рассчитывалось нами исходя из содержания активного хлора на полимере, определенного методом Фольгарда [2] и составляющего 0,54 ммоль/г. Это значение оказалось меньшим, чем содержание хлора, определяемое элементным анализом (0,60 ммоль/г) и указанное фирмой на момент изготовления — 0,67 ммоль/г. Отсюда можно заключить, что при хранении происходит частичная потеря галогена; с другой стороны, количество активного хлора, способного к замещению, несколько ниже, чем общее его содержание. Это может служить причиной расхождений в степенях замещения, приводимых разными авторами.

### Экспериментальная часть

В работе использовали хлорметилированный сополимер стирола с дивинилбензолом (Fluka) с содержанием хлора 0,6 ммоль/г, Вос-аминокислоты производства «Биолар» (Олейше). Диметилформамид хранили над молекулярными ситами 4 Å. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре СФ-26. ИК-спектры записаны на приборе Perkin — Elmer PE G21. Соли Вос-аминокислот готовили по методике [9].

*Холостая проба.* К 200 мг полимера добавляли 1,5 мл DMF и встряхивали при комнатной температуре (18—22° С) или при 50° С в термостате в течение 48 ч. Полимер отфильтровывали, промывали DMF (3×3 мл), смесью DMF — вода, 9 : 1 (3×3 мл), DMF (3×3 мл), этанолом (3×5 мл) и высушивали в вакууме. Пикриновый тест [22] показывал степень замещения ≤ 2%.

Такое же значение было получено при проведении экспериментов по методике, описанной выше, но в присутствии катализатора, взятого в эквивалентном количестве по отношению к хлору.

*Взаимодействие солей Вос-аминокислот с хлорметилированным сополимером стирола с дивинилбензолом.* К 200 мг полимера добавляли соответствующее количество соли Вос-аминокислоты, катализатора (табл. 1—5) и 1,5 мл DMF. Суспензию встряхивали при комнатной темпе-

ратуре или при 50° С в термостате 24 или 48 ч. Полимер отфильтровывали, промывали DMF (3×3 мл), смесью DMF—вода, 9:1 (3×3 мл), DMF (3×3 мл), этанолом (3×5 мл) и высушивали в вакууме. Степень замещения определяли с помощью пикринового теста.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Merrifield R. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. № 14. P. 2149–2154.
2. Стюарт Дж., Янг Дж. Твердофазный синтез пептидов. М.: Мир, 1971. 176 с.
3. Yamashiro D., Li C. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1973. V. 95. № 4. P. 1310–1319.
4. Yadjima H., Kawatani H., Watanabe H. // Chem. Pharm. Bull. 1970. V. 18. P. 1333–1339.
5. Green B., Garson L. R. // J. Chem. Soc. C. 1969. № 3. P. 401–405.
6. Monahan M. W., Gilon C. // Biopolymers. 1973. V. 12. № 11. P. 2513–2519.
7. Loffet A. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1971. V. 3. № 5. P. 297–299.
8. Suzuki K., Endo N. // Chem. and Pharm. Bull. 1977. V. 25. № 5. P. 1143–1146.
9. Gisin B. F. // Helv. chim. acta. 1973. V. 50. № 5. P. 1476–1482.
10. Colombo R., Atherton E., Sheppard R. C., Woolly V. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1983. V. 21. № 2. P. 118–126.
11. Burton J., Poulsen K., Haber E. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 17. P. 3892–3898.
12. Ljungqvist A., Folkers K. // Acta chem. scand. 1984. V. 38. № 5. P. 375–379.
13. Li C. H., Ramasharma K., Yamashiro D., Chung D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 4. P. 959–962.
14. Roeske R. W., Gesellchen P. D. // Tetrahedr. Lett. 1976. № 38. P. 3369–3372.
15. Horiki K., Igano K., Ihonye K. // Chem. Lett. 1978. № 2. P. 165–168.
16. Вебер В., Гокель Г. Межфазный катализ в органическом синтезе. М.: Мир, 1980. 327 с.
17. Nishikubo T., Iizawa V., Kobayashi K., Masuda Y. // Macromolecules. 1983. V. 16. № 5. P. 722–727.
18. Farral M. J., Frechet J. M. J. // J. Amer. Chem. Soc. 1978. V. 100. № 25. P. 7998–7999.
19. Takeishi M., Naito Y., Okawara M. // Angew. Macromolec. Chem. 1973. V. 28. P. 111–119.
20. Hearn M. T. W. // Adv. Chromatogr. 1980. V. 18. P. 59–100.
21. Nakagawa T., Shibukawa A., Kaichara A., Itamochi T., Tanaka H. // J. Chromatogr. 1986. V. 353. P. 399–408.
22. Gisin B. F. // Analyt. chim. acta. 1972. V. 58. № 1. P. 248–249.

Поступила в редакцию  
9.VIII.1988

#### THE ATTACHMENT OF *TERT*-BUTYLOXYCARBONYL AMINO ACIDS TO CHLOROMETHYLATED STYRENE-DIVINILBENZENE COPOLYMER BY PHASE TRANSFER CATALYSIS

KULIKOV S. V., SOKOLOVA N. Yu., LEONOVA E. B., SAMARTSEV M. A.

All-Union Research Institute of Highly Pure Biopreparates,  
Leningrad

Derivatization of Merrifield resin with Boc-amino acid salts proceeds with a higher yield, under milder conditions and with lower amount of the reagent (Boc-amino acids) if carried out in the presence of quaternary ammonium salt, e. g. tetrabutylammonium bromide. The effect is especially significant with the derivatives of polyfunctional amino acids, such as glutamine, serine, threonine, cysteine, aspartic acid, asparagine, and arginine. In most cases potassium rather than caesium salts of acylamino acids are to be used.