



УДК 547.466' 562.315.057

ДИПЕНТАФТОРФЕНИЛКАРБОНАТ — РЕАГЕНТ
ДЛЯ ПЕПТИДНОГО СИНТЕЗА

Медведкин В. Н., Митин Ю. В., Клименко Л. В.,
Подгорнова Н. И.*, Быстриченко А. И.*, Заболотских В. Ф.**,
Коробейникова Л. И.**, Поздеева В. В.**

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.;
* Научно-производственное объединение «Биолар», Олайне, ЛатвССР;
** Пермский филиал ГИПХ

Описано получение дипентафторфенилкарбоната и его применение в синтезе пентафторфениловых эфиров N-защищенных аминокислот. В отличие от многих предложенных к настоящему времени реагентов дипентафторфенилкарбонат отличается простотой получения, высокой реакционной способностью и стабильностью при хранении. Разработаны условия получения пентафторфениловых эфиров N-защищенных аминокислот.

Активация карбоксильной группы N-защищенных аминокислот превращением последних в пентафторфениловые эфиры предложена Кишфалуди с соавт. [1—3] и с тех пор широко применяется в химическом синтезе пептидов. Вместе с тем используемый для получения активированных эфиров аминокислот N,N'-дициклогексилкарбодиимид является сильным аллергеном, что служит серьезным препятствием для его использования в производстве. Поэтому на протяжении ряда лет ведется направленный поиск новых реагентов, позволяющих исключить N,N'-дициклогексилкарбодиимид из схемы синтеза пептидов.

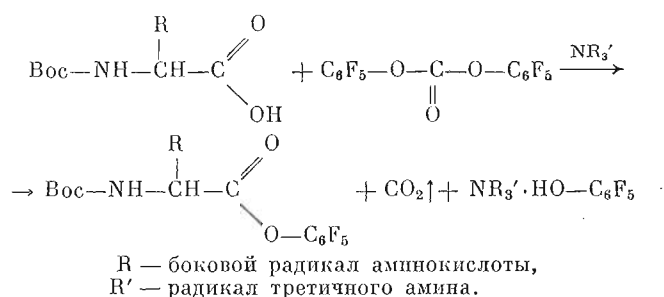
Один из таких реагентов — дипентафторфенилкарбонат, предложенный для получения пентафторфениловых эфиров аминокислот в 1980 г. [4]. Цель настоящей статьи — описание способа получения дипентафторфенилкарбоната и примеров его использования для получения активированных эфиров аминокислот.

Идея использовать эфиры угольной кислоты в качестве переэтерифицирующих реагентов не нова. Еще в 1962 г. Виланд предложил для этих целей бис(*n*-нитрофенил)-карбонат [5]. Однако этот реагент не нашел широкого применения: синтез *n*-нитрофениловых эфиров N-защищенных аминокислот с его помощью протекает очень медленно и при повышенной температуре (50—60°С), поэтому предпочтение было отдано более эффективному способу получения *n*-нитрофениловых эфиров аминокислот с помощью N,N'-дициклогексилкарбодиимида. С появлением других, более реакционноспособных активированных эфиров аминокислот карбодиимидный способ получения активированных эфиров был распространен и на них, превратившись в один из основных методов пептидной химии.

Вместе с тем логично было предположить, что повышение электрофильности арильного остатка в эфирах угольной кислоты приведет к увеличению реакционной способности сложного эфира, что даст возможность успешно осуществлять реакцию переэтерификации. Дипентафторфенилкарбонат является примером карбоната с высокой реакционноспособностью. Пентафторфениловые эфиры производных аминокислот получают с его помощью с высоким выходом при 0—25°С за 30—45 мин. Образование пентафторфениловых эфиров производных аминокислот протекает по представленной схеме. Процесс неравновесный и смещен в

Сокращения: Pfp — пентафторфенил, Tfa — трифторацетил.

сторону образования целевого продукта, так как в результате реакции выделяется углекислый газ.



Реакция взаимодействия дипентафторфенилкарбоната с производным аминокислоты протекает в присутствии основания. Мы изучили влияние природы основания и растворителя на выход продукта реакции.

В качестве основания самым удобным оказался N-метилморфолин, так как его соль с пентафторфенолом плохо растворима в хлороформе и этилацетате. Это облегчает очистку пентафторфениловых эфиров аминокислот. На скорость образования пентафторфениловых эфиров аминокислот природа основания влияет незначительно. Реакция одинаково хорошо протекает в присутствии триэтиламина, пиридина, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамина. Последний удобен тем, что будучи двухосновным органическим основанием, имеет наименьшую эквивалентную массу. Количество добавленного в реакционную смесь основания уменьшается, что облегчает выделение целевого продукта в чистом виде. При работе с триэтиламином следует учитывать, что пентафторфенолят триэтиламмония легче других пентафторфенолятов разлагается с образованием смолистых продуктов, но при точном соблюдении условий активации этот нежелательный процесс удается свести к минимуму. Ионообменные смолы, содержащие третичные или четвертичные алкиламмониевые группы, также катализируют процесс образования пентафторфениловых эфиров аминокислот, но выход целевого продукта при этом невысок. В наших экспериментах он не превышал 70% (синтез Hoc-Cys(Bzl)-OPfr в присутствии избытка анионита «Амберлит А-21», эксперимент не приведен).

В качестве растворителя для проведения реакции можно использовать этилацетат, хлороформ, хлористый метилен, диоксан, тетрагидрофуран, ацетонитрил, в диметилформамиде реакция идет хуже.

Физико-химические характеристики пентафторфениловых эфиров аминокислот, полученных с помощью дипентафторфенилкарбоната, не отличаются от данных, приведенных в работе [3]. Исключение составляет лишь Hoc-Pro-OPfr, который, по нашим данным, имеет $[\alpha]_D^{20} -42^\circ$ (с 1, диоксан), причем это значение нами получено и для активированного эфира, синтезированного с помощью N,N'-дициклогексилкарбодимида.

Дипентафторфенилкарбонат может быть использован как в лабораторной практике, так и в промышленном пептидном синтезе. В этой связи нам представляется интересным оценить преимущества и недостатки реагента.

Дипентафторфенилкарбонат — белый, кристаллический порошок, не гигроскопичен, может храниться неограниченно долго при комнатной температуре без разложения. Чистый препарат практически не имеет запаха. От примесей дипентафторфенилкарбонат можно отделить перекристаллизацией из гексана или (что предпочтительнее) перегонкой в вакууме. Дипентафторфенилкарбонат можно перегонять без разложения и при нормальном давлении (т. кип. 240°C).

Образующаяся в ходе активации аминокислоты и в процессе образования пептидной связи соль пентафторфенола с органическим основанием является исходным сырьем для получения дипентафторфенилкарбоната. Таким образом, можно создать безотходную по пентафторфенолу схему синтеза пептидов.

Мы провели эксперименты, в которых вместо дипентафторфенилкарбоната использовали для активации производных аминокислот пентафторфенилхлорформат и пентафторфенилфторформат. В этом случае на стадию образования пептидной связи расходуется эквивалентное количество пентафторфенола. Однако мы были вынуждены отказаться от использования этих реагентов для активации, несмотря на то что реакция протекает с высоким выходом за несколько минут. Это объясняется тем, что хлор- и фторформаты имеют очень резкий запах, который у описанных реагентов более неприятен, чем, например, запах карбобензоксихлорида.

При использовании дипентафторфенилкарбоната для синтеза пептидов или других соединений без выделения активированного эфира в чистом виде следует учитывать наличие большего, чем обычно, количества пентафторфенола в реакционной среде. Это может осложнить очистку продукта с помощью перекристаллизации: в присутствии пентафторфенола растворимость некоторых пептидов в эфире и гексане увеличивается. Кроме того, при работе с дипентафторфенилкарбонатом без выделения в чистом виде активированного эфира следует иметь в виду возможность образования сшивок аминокислотного компонента с образованием соответствующего производного мочевины.

Обычно после активации производной аминокислоты мы отфильтровывали осадок соли пентафторфенола, упаривали растворитель (в том случае, если реакцию вели не в хлороформе) и пропускали реакционную смесь через колонку (2,5×20 см) с силикагелем, уравновешенным хлороформом или смесью хлороформ — гексан. Такая процедура позволяет удалить следы дипентафторфенилкарбоната и одновременно очистить активированный эфир от остатка соли пентафторфенола. Полученные пентафторфениловые эфиры производных аминокислот использовали для дальнейшей работы без перекристаллизации. Контроль на отсутствие примеси дипентафторфенилкарбоната осуществляли с помощью ТСХ активированного эфира в хлороформе. В этой системе дипентафторфенилкарбонат имеет R_f 0,8–0,9 (Silufol), тогда как пентафторфениловые эфиры производных аминокислот имеют R_f 0,5–0,6 (УФ-детектирование).

Полученные по такой методике пентафторфениловые эфиры производных аминокислот использованы нами для синтеза различных пептидов, в том числе и пептидов эволюционного предшественника кальцийсвязывающих белков [6]. В таблице представлены характеристики пентафторфениловых эфиров производных аминокислот. Типичная методика синтеза пептидов с помощью пентафторфениловых эфиров производных аминокислот опубликована нами ранее [6].

Примером эффективного использования дипентафторфенилкарбоната для получения амидов карбоновых кислот является получение производного *D*-изоглутамина, важного интермедиата в производстве хорошо известного иммуностимулятора — мурамилдипептида. Получение γ -бензилового эфира *Woc-D*-изоглутамина существенно облегчается тем, что аммиач-

Характеристики пентафторфениловых эфиров *N*-защищенных аминокислот, полученных с помощью дипентафторфенилкарбоната

Номер	Активированный эфир	M_r	Выход, %	Т. пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$ *	Литературные данные [3]	
						Т. пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$ *
1	Woc-Ala-OPfp	355	85	85–86	–32(1)	82–83	–31,2(1)
2	Woc-Leu-OPfp	397	93	47–49	–30,5(1)	48–50	–30,2(1)
3	Woc-Phe-OPfp	431	87	113–114	–26,5(1)	111–112	–26,9(1)
4	Woc-Val-OPfp	383	84	63–65	–19(1)	62–64	–18,4(1)
5	Woc-Gly-OPfp	341	93	79–81	—	79–80	—
6	Woc-Lys(Z)-OPfp	546	95	93–95	–18(1)	94–95	–17,1(1)
7	Z-Arg(Z ₂)-OPfp	743	87	72–73	–5,0(2)	Нет данных **	
8	Woc-Lys(Tfa)-OPfp	507	98	132–134	–27,8(3)	»	

* (1) — диоксан, 2 — $CF_3CH_2OH - CHCl_3$, 2 : 1, (3) — CH_3OH .

** Соединения (7) и (8) охарактеризованы также элементным анализом. Получена хорошая сходимость с расчетными данными.

ная соль пентафторфенола практически не растворяется в хлороформе и этилацетате. Поэтому добавление в реакционную смесь концентрированного раствора NH_4OH или, что предпочтительнее, пропускание в раствор газообразного аммиака не только приводит к образованию целевого продукта, но и позволяет отделить практически весь пентафторфенол. Так как других нелетучих продуктов реакционная смесь не содержит, γ -бензиловый эфир *D*-изоглутамина удается получить хроматографически го-могенным без дополнительной очистки.

Экспериментальная часть

В работе использовали производные аминокислот фирм Reanal (Венгрия) и Fluka (Швейцария), пентафторфенол, фосген и остальные реактивы отечественного производства. Температуру плавления определяли на приборе Voetius (ГДР) (не исправляли), элементный анализ проводили на С, Н, N-анализаторе Perkin — Elmer 240В (США), аминокислотный анализ — на анализаторе Durrum D500 (США), удельное вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141А (США). Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле L40/100 (Chemapol, Чехословакия), ТСХ — на пластинках Silufol UV254 (Чехословакия) и Merck F254 (ФРГ). ИК-спектр дипентафторфенилкарбоната в таблетках с КВг получен на приборе Specord 75 IR (ГДР). Типовая методика синтеза пептидов с помощью пентафторфениловых эфиров описана нами ранее [6].

Дипентафторфенилкарбонат. К раствору 18,4 г (0,1 моль) пентафторфенола, 14 мл (0,1 моль) триэтиламина в 150 мл эфира, охлажденному до -20°C , добавили при перемешивании раствор 4,9 г (0,05 моль) фосгена в 50 мл эфира. Перемешивали 30 мин, повышая температуру до комнатной. Отфильтровали гидрохлорид триэтиламина, фильтрат упарили в вакууме, остаток перекристаллизовали из гексана. Выход дипентафторкарбоната количественный. Белый кристаллический порошок (иногда крупные прозрачные кристаллы), т. пл. $48-50^\circ\text{C}$. Найдено, %: С 39,29. $\text{C}_{13}\text{F}_{10}\text{O}_2$. Вычислено, %: С 39,61. ИК (ν , cm^{-1}): 3200, 1810 (C=O), 1520 (C_6F_5), 1225 (C—O—C), 980.

Типовая методика получения пентафторфениловых эфиров производных аминокислот. К раствору 10 ммоль производного аминокислоты в 20 мл органического растворителя (предпочтительно этилацетата) добавляли 1,1 мл (10 ммоль) *N*-метилморфолина и охлаждали до 0°C . Добавляли 4 г (10,5 ммоль) дипентафторфенилкарбоната и перемешивали 40 мин, контролируя процесс протекания реакции с помощью ТСХ. Если за это время реакция не доходила до конца, добавляли дополнительно 0,1 ммоль дипентафторфенилкарбоната и перемешивали 5—10 мин при комнатной температуре. После окончания реакции выпавшие кристаллы пентафторфенолята *N*-метилморфолина отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, растворяли в небольшом (5—10 мл) количестве хлороформа, отделяли осадок соли *N*-метилморфолина (если он образовывался) и хроматографировали на колонке ($2,5 \times 20$ см) с силикагелем, элюент — хлороформ. Фракцию, соответствующую активированному эфиру аминокислоты, упаривали и использовали для дальнейшей работы без дополнительной очистки. Выход 85—98%.

γ -Бензиловый эфир *Woc-D*-изоглутамина. γ -Бензиловый эфир *Woc-D*-глутаминовой кислоты (7,25 г, 21,5 ммоль) растворяли в 60 мл этилацетата и активировали, как описано в типовой методике. Расход дипентафторфенилкарбоната и *N*-метилморфолина для полного завершения активации составил 10,6 г (26 ммоль) и 2,4 мл (22 ммоль) соответственно, время активации — 45 мин. После отделения осадка пентафторфенолята *N*-метилморфолина в реакционную смесь пропускали газообразный аммиак до полного превращения активированного эфира в амид (10—15 мин). Осадок пентафторфенолята аммония отделяли, фильтрат упаривали, образовавшееся масло растирали в гексане и сушили в вакууме. Выход *Woc-D*-Glu (OBzl)- NH_2 6,64 г (92%). Т. пл. $123-124^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} +2,5^\circ$ (*c* 1, уксусная кислота); [7]: т. пл. 124°C , $[\alpha]_D^{20} +2^\circ$ (*c* 1, уксусная кислота).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kisfaludy L., Cerpini M. Q., Rakoczy B., Kovach J. // Peptides, Proc. of 8th European Peptide Symposium/Eds Beyerman H. C., van de Linde A., Maassen van den Brink W. Amsterdam: North Holland Publ., 1967. P. 25-27.
2. Kisfaludy L., Roberts J. E., Johnson R. H., Mayers G. L., Kovacz J. // J. Org. Chem. 1970. V. 35. № 10. P. 3563-3565.
3. Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I. // Lieb. Chem. 1973. № 9. P. 1421-1429.
4. Медведкин В. Н. Способ получения пентафторфениловых эфиров аминокислот. А. с. 724501 СССР // Б. И. 1980. № 12. С. 85.
5. Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl). Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1974. В. XV/2. Teil 2. S. 14-16.
6. Гречишко В. С., Медведкин В. Н., Запсвалова Н. П., Юнг Р., Митин Ю. В. // Био-орган. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1465-1473.
7. Lejancier P., Bricas I. E. // Bull. Soc. chim. belg. 1967. V. 49. № 10. P. 12-57.

Поступила в редакцию
30.VIII.1988

DIPENTAFLUOROPHENYLCARBONATE, A REAGENT FOR PEPTIDE SYNTHESIS

MEDVEDKIN V. N., MITIN Yu. V., KLIMENKO L. V., PODGORNOVA N. N.*,
BYSTRICHENKO A. I.*, ZABOLOTSKIKH V. F.***, KOROBEINIKOVA L. I.**,
POZDEYEVA V. V.**

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino, Moscow Region: * NPO «Biolar»,
Olaine, Riga Region;*

*** Institute of Applied Chemistry, Perm*

Dipentafluorophenylcarbonate, belonging to transesterifying reagents, has been prepared and used for the synthesis of pentafluorophenyl esters of amino acids. In contrast to many other reagents of the kind, its preparation is simple, it is highly reactive and at the same time stable upon storage.