



УДК 541.49:547.963.4.057

© 1993 Р. П. Евстигнеева, Л. К. Лубсандоржиева,
Г. А. ЖелтухинаСИНТЕЗ МОНО-С-АМИНОАЦИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ПРОТОГЕМИНА IX ТВЕРДОФАЗНЫМ МЕТОДОМ*Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Осуществлен синтез ряда пептидных производных протогемина IX на твердой фазе с использованием гидрофильного полиамидного полимера «TRILAR^(R)» ступенчатым наращиванием с С-конца методом активированных эфиров.

Пептидные производные порфиринов и их металлокомплексов находят все более широкое применение в различных областях науки и техники. В частности, они используются в качестве субстратов для определения активности протеолитических ферментов [1]; как каталитические системы — в процессах органического синтеза [2], в технике — в качестве поглотителей молекулярного O₂. Как модельные системы они используются для изучения процесса оксигенации с последующим возможным получением на их основе переносчиков кислорода.

При создании модельных систем для изучения взаимосвязи между структурой и функциями гемоглобина, миоглобина представляется важным соответствие их по структуре природным переносчикам кислорода. В качестве таких моделей можно рассматривать несимметричные бис-С-аминоацильные производные протогемина IX*, в которых по пропионовокислым остаткам присоединены разные по аминокислотному составу и длине пептиды, моделирующие окружение гема в гемоглобине.

При получении подобных соединений большую трудность представляет введение пептидной цепи только по одному из пропионовокислых остатков порфирина.

Впервые в 1957 г. Лауч и Шредер [3] предложили синтез С-аминоацильных производных мезогема, который состоял во взаимодействии азида мезопорфирина IX с аминокислотами и полипептидами, имеющими свободные аминогруппы, с последующим введением железа в порфириновое кольцо. Этот метод оказался очень сложным и непригодным для порфиринов, содержащих винильные группы.

Позднее Лоссе и Мюллером [4] карбодиимидным методом была осуществлена конденсация протогемина IX с эфирами аминокислот. В результате было получено его симметричное бис-С-аминоацильное производное. Кроме того, было показано образование побочного продукта — производного ацилмочевины [5].

Для создания моно-С-аминоацильных производных порфиринов с последующим получением несимметричных бис-С-аминоацильных производных были предложены различные пути. Например, был использован метод смешанных ангидридов. Наиболее удачным реагентом для получения смешанного ангидрида по пропио-

Сокращения: -OPfp — пентафторфенилокси-, DMF — диметилформамид, TFA — трифторуксусная кислота.

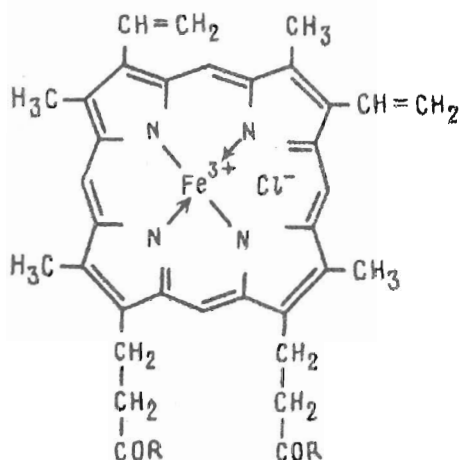
* Термин «С-аминоацильные производные протогемина IX» соответствует присоединению аминоацильного остатка по карбоксилу пропионовой кислоты протогемина IX.

нильной группе протогемина IX оказался этилхлорформат. Однако и в этом случае был получен 6(7)-монометильный эфир N^α-гистидилдейтерогемина IX с выходом лишь 17% [6]. Моно-С-аминоацильные производные протогемина IX можно получать целенаправленно из монобензильного эфира протогемина IX [7].

Одним из подходов к синтезу моно-С-аминоацильных производных протогемина IX явился модифицированный карбодиимидный метод [8], в котором был предложен эффект концентрационного разбавления. Раствор N,N'-дициклогексилкарбодиимида медленно вводится в раствор протогемина IX в диметилформамиде в присутствии N-гидроксисукцинимиды или пентафторфенола. При этом образуются моно-N-оксисукцинимидные или пентафторфениловые эфиры протогемина IX, которые в дальнейшем взаимодействуют с N^α-незамещенными пептидами. Этот метод синтеза моно-С-аминоацильных производных протогемина IX достаточно удобен и позволяет получать целевые вещества с довольно высокими выходами.

Синтез подобных сложных соединений классическими методами в растворе состоит из двух частей: 1) синтез соответствующих пептидов; 2) конденсация активированного по одному из пропионовокислых остатков производного протогемина IX с N^α-незамещенными пептидами. Каждая из частей представляет собой отдельную сложную задачу. Большую трудность, например, составляет выбор растворителя для проведения реакции конденсации вследствие различной растворимости синтетических пептидов и протогемина IX. Все это требует дальнейшего совершенствования методологии синтеза подобных соединений.

Нами осуществлен синтез ряда моно-С-аминоацильных производных протогемина IX (I—V) твердофазным методом.



Если в одной из цепей R = -OH,
то в другой R равно

-ValPheOCH ₃	(I)
-LeuLeuValPheOCH ₃	(II)
-LeuHisOCH ₃	(III)
-LeuHisAlaOCH ₃	(IV)
-LeuHisNHCC ₁₀ H ₂₀ COOCH ₃	(V)

Соединения (I—III) ранее были получены классическими методами в растворе [8, 9]. Нами они были выбраны для возможности сравнения физико-химических характеристик гемин-пептидов (I—III), полученных на твердой фазе. Соединения (IV, V) были синтезированы нами с целью поиска новых модельных систем, а также для увеличения гидрофобности гемового окружения.

В качестве полимерной матрицы мы использовали полимерный носитель «TRILAR^(R)» [10]. Этот полиамидный шитый сополимер на основе винилпирролидона, содержащий реакционноспособные аминогруппы, хорошо набухает и в полярных, и в неполярных растворителях. В качестве якорной группы в него вводили остаток α-бромпропионовой кислоты.

При синтезе пептидов на полимере присоединение стартовых Вос-аминокислот к бромпропионилированному носителю (P-Br) проводили методом цезиевых солей [11], блокирование остаточных аминогрупп и остаточного галоида — 5-кратным избытками соответственно *n*-нитрофенилацетата с добавкой 1-гидроксисензотриазола [12] и ацетата цезия [13] (см., например, схему). Для создания пептидной

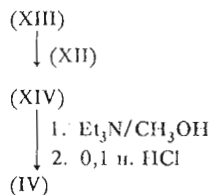
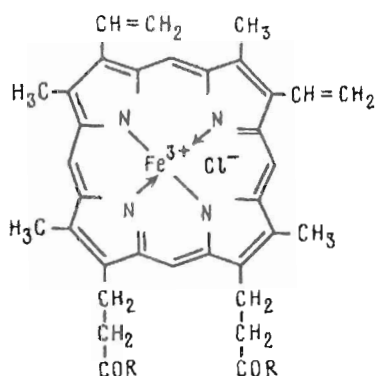
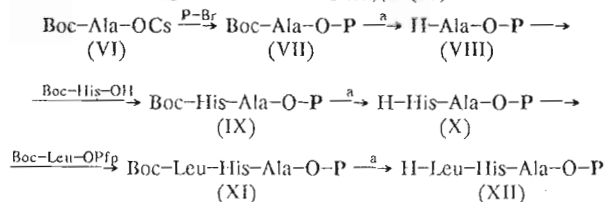
связи применяли активированные пентафторфениловые эфиры Вос-аминокислот. Снятие Вос-защиты проводили двукратной обработкой в течение 20 мин каждая 50% раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле. О полном деблокировании N^α-аминогрупп в результате такого воздействия свидетельствовало отсутствие окраски в тесте с применением солей ртути и 6 н. H₂SO₄ [14].

С помощью количественного аминокислотного анализа в ходе синтеза Вос-Val-Phe-O-P показано, что последующая 2-кратная 10-минутная обработка 10% раствором триэтиламина в диметилформамиде с целью нейтрализации трифторуксусной кислоты приводит к снижению содержания пептида на полимере (содержание фенилаланина в аминоацилполимере — 0,5 ммоль/г, а в дипептидилполимере — 0,3 ммоль/г). Вероятно, это связано с отщеплением пептида от полимера в приведенных условиях вследствие щелочеабильности якорной группы. В дальнейшем мы уменьшили время обработки до 5 мин, используя 5% раствор триэтиламина в диметилформамиде. Правильность наших предположений была подтверждена результатами определения содержания аминокислот в пептидилполимере с помощью пикриновой кислоты [15]. Содержание аминокислоты в аминоацилполимере совпало с содержанием дипептида в дипептидилполимере.

При синтезе Вос-Leu-His-O-P гистидин был введен в полимер в виде Вос-His(Вос)-ОН в присутствии эквивалентного количества триэтиламина. Выбор *трет*-бутилоксикарбонильной группы в качестве защиты имидазольной функции гистидина обусловлен необходимостью предотвращения побочных реакций в С-концевом гистидине, а также возможностью снятия ее легким кислотным воздействием. В других случаях производное гистидина использовалось с незащищенной боковой функцией.

Первоначальное использование нами для введения гемина в пептидилполимеры метода смешанных ангидридов с применением пивалоилхлорида привело к получению целевых монопроизводных протогемина IX с незначительными выходами, а в некоторых случаях — к преимущественному образованию биспроизводных. Вероятно, применение смешанных ангидридов, широко распространенное в классических методах синтеза в растворе, непригодно для конденсации гемина с аминокислотным компонентом, находящимся на полимере, вследствие невысокой устойчивости образующихся смешанных ангидридов гемина по его пропионильной группе и разных кинетических параметров реакций конденсаций, проводимых в гомогенных и гетерогенных условиях.

Синтез гемин-пептида (IV)



Если в одной из цепей R = -OH, то в другой
R = -ONSu (XIII)
-Leu-His-Ala-O-P (XIV)
-Leu-His-Ala-OCH₃ (IV)

P-Br = TRILAR^(R)-COC(Br)HCH₃; a: 50% TFA/CH₂Cl₂

Более удачным оказалось использование метода N-оксисукцинимидных эфиров. Моно-N-оксисукцинимидный эфир гемина получали по модифицированному карбодимидному методу [8] и вводили в реакцию конденсации с пептидилполимером в диметилформамиде. Синтезированные гемин-пептиды (I—V) были получены отщеплением от полимера переэтерификацией 20% раствором триэтиламина в метаноле и последующей очисткой колоночной хроматографией на силикагеле L40/100.

Строение полученных соединений (I—V) было подтверждено элементарным анализом, количественным аминокислотным анализом, методами электронной и ИК-спектроскопии, а также масс-спектрометрией.

Таким образом, использование моно-N-оксисукцинимидных эфиров протогемина IX при создании амидной связи с пептидилполимером приводит к преимущественному образованию моно-C-аминоацильных производных. Следует отметить, что при синтезе подобных моделей с короткими пептидами, где существенную роль играют стерические факторы (объемность гемина и таких остатков аминокислот, как Leu, Val, Phe, His, небольшое расстояние между молекулой гемина и полимером), твердофазный метод стоит в одном ряду с другими существующими методами синтеза. Так, соединения (I) и (III) были получены нами с выходами и физико-химическими константами, совпадающими с приведенными в литературе для соединений, синтезированных в растворе [8, 9]. Однако, если при синтезе монопептидных производных протогемина IX классическими методами в растворе удлинение пептидной цепи приводило к снижению выходов (выход гемин-пептида (II) составил 23,5%, считая на тетрапептид [9]), то твердофазным методом гемин-пептид (II) был получен нами с выходом 62,1%, считая на исходный фенилаланин.

Полученные нами в данной работе результаты исследований показывают перспективность применения твердофазного метода при синтезе моно-C-аминоацильных производных протогемина IX. Одним из существенных преимуществ твердофазного метода перед классическими методами синтеза в растворе является возможность регенерации протогемина IX.

Экспериментальная часть

В синтезе использовали производные L-аминокислот (Reanal, Венгрия). Индивидуальность полученных соединений подтверждали ТСХ на силуфоле (Chemapol) в системах: хлороформ — метанол, 9:1 (А) и 4:1 (Б). Полноту протекания реакций конденсации на полимере проверяли с помощью полуколичественного нингидринового теста [16]. Содержание первой аминокислоты на полимере и остаточных аминогрупп после присоединения гемина определяли с помощью пикриновой кислоты [15]. Гидролиз гемин-пептидов проводили в смеси 12 н. соляной и пропионовой кислот (1:1) при 140° С в течение 4 ч. Аминокислотный состав гемин-пептидов определяли на анализаторе Biotronik (ФРГ). Полноту отщепления Вос-защиты проверяли с помощью HgSO₄ и 6 н. H₂SO₄ [14]. Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле марки L40/100 (Chemapol, Чехо-Словакия). Масс-спектры высокого разрешения получали на приборе Finnigan MRT 90. Электронные и ИК-спектры снимали на приборах Shimadzu UV-240 и Shimadzu UR-435 (Япония) соответственно. α-Бромпропионильную группу вводили по аминогруппам полимера (1,05 ммоль/г) действием 1,5-кратного избытка симметричного ангидрида α-бромпропионовой кислоты в течение 1 ч при 20° С (1,021—1,12 ммоль/г брома).

Снятие Вос-защиты осуществлялось по следующей схеме: 1) промывка хлористым метиленом, 2×2 мин; 2) обработка 50% раствором TFA в хлористом метилене, 2×20 мин; 3) промывка хлористым метиленом; 2×2 мин; 4) промывка DMF, 2×2 мин; 5) нейтрализация 5% раствором Et₃N в DMF, 2×5 мин; 6) промывка DMF, 2×2 мин. Объем однократной промывки 5 мл.

б(7)-(Метиловый эфир N^α-лейцилгистидилаланил)протогемин IX (IV). К 1 г

полимера, содержащего 1,021 ммоль/г α -бромпропионильных групп, прибавляли раствор 0,98 г (3,06 ммоль) Вос-Ala-OCs (VI) в 7 мл DMF, перемешивали 20 ч при 40° С и выдерживали 70 ч без перемешивания при 20° С. Аминоацилполимер (VII) отделяли, промывали DMF, хлороформом, метанолом, хлороформом (все 2×2 мин). Объем одной промывки 5 мл. Для блокирования остаточных аминогрупп аминоацилполимер (VII) выдерживали 12 ч в растворе 0,026 г (0,145 ммоль) *l*-нитрофенилацетата и 0,02 г (0,145 ммоль) 1-гидроксibenзотриазола в 5 мл DMF. Содержание аланина в аминоацилполимере (VIII) 0,4 ммоль/г. Замещение остаточного галоида проводили исходя из 0,59 г (3,1 ммоль) ацетата цезия в 5 мл DMF. Нингидриновый тест и проба Бельштейна — отрицательные. Остаток гистидина вводили в аминоацилполимер (VIII) в виде раствора 0,305 г (1,2 ммоль) Вос-His-OH в 5 мл DMF, выдерживали 20 ч при 20° С без перемешивания. Нингидриновый тест — отрицательный. Раствор 0,48 г (1,2 ммоль) Вос-Leu-OPfr в 5 мл DMF прибавляли к N^α-деблокированному дипептидилполимеру (X), выдерживали 22 ч без перемешивания. Нингидриновый тест — отрицательный.

Раствор 0,6 г (0,8 ммоль) моно-N-оксисукцинимидного эфира протогемина IX (XIII) [8] в 5 мл DMF прибавляли к 0,5 г H-Leu-His-Ala-O-P (XII), выдерживали 24 ч без перемешивания при 20° С. Гемин-пептидилполимер отделяли, промывали аналогично описанному для аминоацилполимера (VII). Содержание остаточных аминогрупп 0,017 ммоль/г. К 0,38 г гемин-пептидилполимера (XIV) прибавляли 5 мл 20% раствора Et₃N в метаноле, выдерживали 24 ч без перемешивания при 20° С. Полимер отделяли, промывали метанолом (2×3 мл). Фильтрат упаривали, остаток очищали на колонке (2×40 см), элюируя смесью хлороформ — метанол (9:1). Полученный продукт растворяли в 3 мл смеси хлороформ — метанол (9:1), встряхивали с 3 мл 0,5 н. раствора HCl, обрабатывали 3 мл 2% раствора NaHCO₃, промывали водой до нейтральной реакции. Выход гемин-пептида (IV) 0,09 г (52,9%), R_f 0,45 (A), электронный спектр (хлороформ — метанол, 9:1), λ_{max} , нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 402 (124,6), 501 (8,3), 634 (3,3). ИК-спектр*, ν , см⁻¹: 3310 (NH-), 1741 (CO сл. эф.), 1650 (амид I), 1560 (амид II). Найдено, %: С 58,12, Н 5,99, N 12,15. C₅₀H₅₇N₉O₇FeCl₂·2H₂O. Вычислено, %: С 58,68, Н 6,01, N 12,32. Масс-спектр, *m/z*: M⁺ 952. Аминокислотный анализ: Leu 1,1 (1), His 0,9 (1), Ala 1,0 (1).

6(7)-(Метилловый эфир N^α-лейцилгистидил-11-аминоундеканоил)протогемин IX (V). К 2 г полимера, содержащего 1,021 ммоль/г α -бромпропионильных групп, прибавляли раствор 2,66 г (6,31 ммоль) Вос-NHC₁₀H₂₀CO OCs в 15 мл DMF, выдерживали 12 ч при 40° С и 72 ч при 20° С. Аминоацилполимер отделяли, промывали аналогично описанному для соединения (IV). Содержание аминокислоты в аминоацилполимере 0,45 ммоль/г. Блокирование остаточных аминогрупп проводили исходя из 0,05 г (0,29 ммоль) *l*-нитрофенилацетата и 0,04 г (0,29 ммоль) 1-гидроксibenзотриазола. Нингидриновый тест — отрицательный. Замещение остаточного брома проводили раствором 1,16 г (5,81 ммоль) ацетата цезия в 15 мл DMF. Проба Бельштейна — отрицательная. Остаток гистидина присоединяли к аминоацилполимеру с помощью раствора 0,686 г (2,7 ммоль) Вос-His-OH в 15 мл DMF. Нингидриновый тест — отрицательный. Раствор 0,95 г (2,4 ммоль) Вос-Leu-OPfr в 10 мл DMF прибавляли к H-His-NHC₁₀H₂₀COO-P, выдерживали 24 ч при 20° С без перемешивания. Вос-Leu-His-NHC₁₀H₂₀COO-P отделяли, промывали как описано для соединения (IV). Нингидриновый тест — отрицательный. Присоединение моно-N-оксисукцинимидного эфира протогемина IX к 1,5 г H-Leu-His-NHC₁₀H₂₀COO-P проводили аналогично описанному для соединения (IV). Содержание остаточных аминогрупп 0,2 ммоль/г. Отщепление гемин-пептида (V) от полимера, очистку и дальнейшую обработку проводили как описано для соединения (IV). Выход гемин-пептида (V) 0,11 г (63,4%), R_f 0,37 (A), электронный спектр (хлороформ), λ_{max} , нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 401,5 (98,9), 508 (6,6), 639,9

Здесь и далее растворитель для ИК-спектра тот же, что и для съемки электронного спектра.

(2,74). ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3300 (NH-), 1740 (CO сл. эф.), 1650 (амид I), 1550 (амид II). Найдено, %: C 61,03, H 6,75, N 11,05. $\text{C}_{58}\text{H}_{73}\text{N}_9\text{O}_7\text{FeCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: C 61,34, H 6,83, N 11,1. Масс-спектр, m/z : $[\text{M} + 3\text{H}]^+$ 1067. Аминокислотный анализ: Leu 1,11 (1), His 0,98 (1).

6(7)-(Метилловый эфир N^α -лейцилгистидил)протогемин IX (III). Выход 86,3%, R_f 0,4 (Б), электронный спектр (хлороформ — метанол, 10:1), λ_{max} , нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 402 (57,5), 531 (6,4), 640 (1,05). ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3400 (NH-), 1741 (CO сл. эф.), 1666 (амид I), 1536 (амид II). Найдено, %: C 59,54, H 5,89, N 11,95. $\text{C}_{47}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_6\text{FeCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: C 59,28, H 5,93, N 11,77. Масс-спектр, m/z : M^+ 880. Аминокислотный анализ: Leu 1,12 (1), His 0,98 (1) (ср. [9]: выход 90%, считая на дипептид).

6(7)-(Метилловый эфир N^α -валилфенилаланил)протогемин IX (I). Выход 70,6%, R_f 0,6 (А), электронный спектр (хлороформ), λ_{max} , нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 389,3 (80,0), 512,9 (9,01), 540,9 (7,7). ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3248 (NH-), 1730 (CO сл. эф.), 1642 (амид I), 1554 (амид II). Найдено, %: C 64,56, H 5,64, N 9,11. $\text{C}_{49}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_6\text{FeCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: C 64,51, H 5,74, N 9,21. Масс-спектр, m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ 877,5. Аминокислотный анализ: Phe 1,0 (1), Val 1,04 (1) (ср. [8]: выход 90%, считая на дипептид).

6(7)-(Метилловый эфир N^α -лейциллейцилвалилфенилаланил)протогемин IX (II). Выход 62,1%, R_f 0,45 (А), электронный спектр (хлороформ), λ_{max} , нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$): 387 (46,0), 512 (6,9), 543 (6,0), ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3250 (NH-), 1730 (CO сл. эф.), 1640 (амид I), 1540 (амид II). Найдено, %: C 63,25, H 6,73, N 9,8. $\text{C}_{61}\text{H}_{74}\text{N}_8\text{O}_8\text{FeCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: C 63,35, H 6,62, N 9,68. Масс-спектр, m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1104,7. Аминокислотный анализ: Leu 1,8 (2), Val 1,09 (1), Phe 1,01 (1) (ср. [8]: выход 23,5%, считая на тетрапептид). Выходы соединений (I)–(V), синтезированных на твердой фазе, даны в расчете на исходную аминокислоту.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eishun T., Etsuo H., Tatsuga K. // *Macromolecules*. 1978. V. 11. № 5. P. 947–955.
2. Трусов П. Ю. и др. // *Журн. физ. химии*. 1986. Т. 60. С. 1256–1259.
3. Lautsch W., Schröder E. // *Monats. Chem.* 1957. B. 88. S. 432–459.
4. Losse G., Müller E. // *Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem.* 1962. B. 327 S. 205–216.
5. Jackson A. H. et al. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*. 1982. № 7. P. 1441–1448.
6. Momenau M., Rouge M., Loock B. // *Eur. J. Biochem.* 1976. V. 71. P. 63–76.
7. Молокоздов А. С., Филиппович Е. И., Казакова Н. А., Евстигнеева Р. П. // *Журн. общ. химии*. 1977. Т. 47. С. 1168–1172.
8. Радюхин В. А., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П. // *Журн. общ. химии*. 1980. Т. 50. С. 673–678.
9. Радюхин В. А., Казакова Н. А., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П. // *Журн. общ. химии*. 1982. Т. 52. № 2. С. 432–440.
10. Aukone G., Gibiete I., Podgornova N., Kalejs U. // *Solid Phase Synthesis Peptides, Polypeptides and Oligonucleotides. I International Symp. Oxford, England*. 1989. P. 427–433.
11. Gisin B. F. // *Helv. chim. acta*. 1973. V. 56. P. 1476–1482.
12. Желтухина Г. А., Сидорова М. В., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П. // *Журн. орган. химии*. 1978. Т. 48. № 5. С. 1171–1172.
13. Желтухина Г. А., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П. А. с. 777025 СССР // *Б. И.* 1980. № 41.
14. Калей У. Д., Габиева И. Л., Ауконе Г. И. // *Изв. АН ЛатвССР*. 1990. № 1. С. 94–96.
15. Gisin B. F. // *Anal. chim. acta*. 1975. V. 58. № 1. P. 248–249.
16. Kaiser E., Colosco R., Bossinger C., Cook P. // *Anal. Biochem.* 1970. V. 34. P. 595–598.

Поступила в редакцию
30.X.1992

После доработки
29.XII.1992

**SYNTHESIS OF MONO-C-AMINOACYL DERIVATIVES
OF PROTOHEMIN IX BY THE SOLID PHASE METHOD**

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

We have synthesized mono-C-aminoacyl derivatives of protohemin IX by the solid phase method using pentafluorophenyl esters of Boc-amino acids. The resin was «TRILAR^(R)» copolymer on the basis of N-vinylpyrrolidine with the α -bromopropionyl anchorage. Mono-N-hydroxysuccinimidyl ester of protohemin IX was used as an active derivative of protohemin IX. Mono-C-aminoacyl derivative of protohemin IX was cleaved off the solid phase by re-esterification with 20% Et₃N/MeOH, and purified by the liquid chromatography on silica gel L 40/100.