



УДК 577.466.55

## ЭФФЕКТИВНАЯ БЕЗВОДНАЯ АПРОТОННАЯ СИСТЕМА ДЛЯ РАСТВОРЕНИЯ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

© 1999 г. М. Г. Ряднов, Л. В. Клименко, Ю. В. Митин<sup>#</sup>

Институт белка РАН, 142292, Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 07.09.98 г. Принята к печати 21.01.99 г.

Предложена эффективная система, состоящая из диметилформаида, неорганической добавки и третичного основания, для растворения свободных аминокислот и их производных с целью использования их в пептидном синтезе. В качестве неорганической добавки служат нейтральные соли –  $\text{CF}_3\text{COONa}$ ,  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{BaI}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Данные соединения, увеличивая растворимость свободных аминокислот в диметилформаиде, позволяют получать истинные растворы аминокислот с концентрациями 0.2–3 М. В качестве третичных оснований предпочтительными являются триэтиламин и *N*-метилморфолин. Эта система была использована в реакциях с ацилирующими агентами ( $\text{Woc}_2\text{O}$ , *Z*-OSu, Fmoc-OSu, активированные  $N^\alpha$ -защищенные производные аминокислот или пептидов). Получены соответствующие производные аминокислот,  $N^\alpha$ -защищенные ди-, три- и тетрапептиды с выходами 80–99% при времени реакции 30–240 мин.

*Ключевые слова:* аминокислоты; производные аминокислот; пептиды; апротонные растворители.

Синтез пептидов и производных аминокислот в безводных апротонных полярных органических растворителях с использованием свободных аминокислот ограничен крайне низкой растворимостью последних в таких растворителях. Хотя и существует несколько способов получения пептидов в присутствии неорганических оснований со сравнительно низкими выходами (<80%) и синтеза производных аминокислот с высокими выходами в водно-органических средах (например, вода–ацетонитрил) [1–4], однако эти способы неприменимы для синтеза пептидов с помощью чувствительных к влаге методов (TBTU-NOBt, EDC-NOBt) с использованием свободных аминокислот, растворенных в таких растворителях. Из литературы известно, что увеличение выходов некоторых реакций (например, *O,N*-алкилирование, конденсация пептидных фрагментов) в апротонных растворителях является следствием понижения концентрации цвиттер-ионной формы аминокислот [5–7].

Ранее мы разработали органическую систему растворителей для свободных аминокислот и их производных, состоящую из апротонного растворителя (диметилформаид, гексаметилфосфорамид), сильной кислоты ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{HBF}_4$ ,

$\text{TosOH}$  и т.д.) и избытка основания с  $pK < 6$  (пиридин, диметиланилин) [6]. Наши дальнейшие исследования показали, что вместо сильных кислот, содержащих свободный протон, в качестве одного из компонентов системы могут выступать кислоты Льюиса ( $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{BF}_3$ ,  $\text{SbCl}_5$  и т.д.) [7]. Но использование в качестве основания в обеих системах третичного амина с  $pK > 6$  вызывало осаждение аминокислот из раствора. Кроме того, сравнительно низкие скорости реакции ацилирования аминокислот и низкие выходы, 60–75%, в случае синтеза Fmoc-, Woc- и *Z*-производных, в этих системах растворителей явились причиной поиска более подходящей системы растворителей. Мы проверили несколько неорганических соединений, способных растворяться в апротонных растворителях (диметилсульфоксид, гексаметилфосфорамид, диметилформаид, тетраметилмочевина), и нашли, что только некоторые из них могут значительно увеличить растворимость аминокислот. На наш взгляд наиболее удачным вариантом оказалась система на основе диметилформаида. Основным преимуществом этой системы является совместное использование нейтральных солей ( $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{CF}_3\text{COONa}$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{BaI}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) в качестве добавок и третичного основания с  $pK > 6$  (триэтиламин, *N*-метилморфолин). Интересно отметить, что такие неорганические соединения, как  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{NaI}$ ,  $\text{CdI}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  также эффективны для растворения аминокислот в апротонных растворителях, но только в присутствии третичного амина с  $pK < 6$  (пиридин, диметиланилин)

Сокращения: EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиймид; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; NOBt – 1-гидроксibenзотриазол; Mbh – 4,4'-диметоксибензгидрил; OPfr – пентафторфенилокси; TBTU – тетрафторборат *O*-бензотриазолил-*N,N,N'*-тетраметилуруния; TEA – триэтиламин; OSu – сукцинимидокси.

<sup>#</sup> Автор для переписки (факс: (095) 924-04-93; e-mail: mitin@vega.protres.ru).

**Таблица 1.** Растворимость аминокислот и их производных (моль/л) в 3 М растворе неорганической добавки в DMF

Аминокислота	Неорганическая добавка			Аминокислота	Неорганическая добавка		
	Ba(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	В отсутствие добавки		Ba(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	В отсутствие добавки
Ala	1.5	0.9	0.023	Thr	0.6	0.46	0.01
Arg	1.6	1.2	0.019	Trp	>10	>10	0.041
Asn	0.5	0.42	0.012	Tyr	0.25	0.01	0.005
Asp	0.4	0.21	0.001	Val	0.63	0.4	0.010
Cys	0.60	0.48	0.002	Arg(NO <sub>2</sub> )	3	2.4	0.027
Gln	0.56	0.47	0.009	Asn(Mbh)	1.5	0.7	0.024
Glu	0.53	0.32	0.003	Asp(OBu')	1.3	0.63	0.005
Gly	1.2	0.85	0.022	Cys(Bzl)	0.62	0.5	0.008
His	0.52	0.43	0.005	Gln(Mbh)	1.4	0.67	0.02
Ile	0.55	0.38	0.021	Glu(OBu')	2.9	1.6	0.012
Leu	0.65	0.41	0.028	His(Bzl)	1.2	0.5	0.016
Lys	0.23	0.15	0.002	Lys(Z)	0.45	0.17	0.009
Met	1.1	0.55	0.015	Ser(Bzl)	2.5	1.8	0.01
Phe	3	2.6	0.022	Thr(Bu')	2	1.5	0.026
Pro	>10	>10	0.04	Tyr(Bzl)	0.4	0.31	0.012
Ser	0.8	0.5	0.007				

**Таблица 2.** Производные аминокислот, синтезированные в системе 3 М раствор неорганической добавки в DMF в присутствии ТЕА (1 ммоль на 1 ммоль аминокислоты)

Ацилирующий агент	Аминокислота	Неорганическая добавка	Продукт реакции	Выход, %	Т. пл., °С (лит. данные)
Вос <sub>2</sub> O	Trp	BaI <sub>2</sub>	Вос-Trp-OH*	93	140–141 (140.5–141 [8])
Вос <sub>2</sub> O	Phe	CF <sub>3</sub> COONa	Вос-Phe-OH	96	84–86 (85–86 [9])
Вос <sub>2</sub> O	Asp(OBu')	Ba(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Вос-Asp(OBu')-OH	95	59–64 (57–62 [10])
Z-OSu	Trp	Ca(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Z-Trp-OH	95	126 (126 [11])
Z-OSu	Phe	CF <sub>3</sub> COONa	Z-Phe-OH*	90	87–90 (86–89 [12])
Z-OSu	Ala	Ba(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Z-Ala-OH*	93	85–87 (86–87 [13])
Fmoc-OSu	Trp	NaClO <sub>4</sub>	Fmoc-Trp-OH	94	164–166 (165–166 [14])
Fmoc-OSu	Phe	Ba(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Fmoc-Phe-OH*	94	180–182 (181–183 [14])
Fmoc-OSu	Ile	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Fmoc-Ile-OH	89	146–147 (145–147 [14])

\* Очищали с помощью колоночной хроматографии (см. "Эксперимент. часть").

или в полном отсутствии такового. Ни одно из других протестированных родственных соединений (LiClO<sub>4</sub>, RbClO<sub>4</sub>, CF<sub>3</sub>COOK, (CF<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca, CF<sub>3</sub>COOCs, CF<sub>3</sub>COOLi, NaI, KI, CdI<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>COONa, (C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>COO)<sub>2</sub>Ba, (C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>COO)<sub>2</sub>Ca и т. п.) не подходит для растворения аминокислот в апротонных растворителях.

Растворимость аминокислот в диметилформамиде, содержащем Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Ca(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>COONa, NaClO<sub>4</sub>, BaI<sub>2</sub> в качестве добавки, увеличена на один–два порядка (табл. 1). Присутствие

триэтиламина и *N*-метилморфолина (>1 ммоль аминокислоты) не является препятствием для формирования гомогенного раствора в отличие от ранее описанных систем [6, 7]. Все природные аминокислоты растворяются в этой системе. Производные аминокислот с защищенными боковыми группами, Asn(Mbh), Asp(OBu'), Cys(Bzl), Gln(Mbh), Glu(OBzl), His(Bzl), Lys(Z), Ser(Bzl), Thr(Bu'), Tyr(Bzl) лучше растворимы, чем соответствующие свободные аминокислоты. Некоторые аминокислоты хорошо растворяются в этой системе при комнатной температуре (Pro, Trp,

Phe, Cys(Bzl), Asn(Mbh)), а растворение других аминокислот следует проводить при повышенной температуре (70–80°C), последующее затем охлаждение до комнатной температуры не вызывает нарушение гомогенности раствора. Таким образом, каждая аминокислота или ее производное с защищенной боковой группой может быть растворена в этой системе. Увеличение концентрации неорганической добавки в диметилформамиде способствует увеличению растворимости аминокислот (рис. 1).

Аминокислоты, растворенные в этой системе, легко взаимодействуют с ацилирующими агентами ( $\text{Vos}_2\text{O}$ , Fmoc-OSu, Z-OSu и активированными  $N^\alpha$ -защищенными производными аминокислот или пептидов). Ациламино кислоты и пептиды получают достаточно быстро и с высокими выходами. Синтез производных аминокислот завершается через 2 ч независимо от природы аминокислоты (табл. 2). Выходы производных аминокислот практически не зависят от того, какая из неорганических добавок используется. Это было продемонстрировано на примере производных триптофана, синтезированных в данной системе с различными неорганическими добавками (табл. 3). Во всех случаях выходы составили >90%. Следует принять во внимание, что триэтиламин катализирует разрушение  $\text{Vos}_2\text{O}$ , и для синтеза Vos-аминокислот с помощью  $\text{Vos}_2\text{O}$  необходимо использовать его избыток.

Предпочтительное использование третичного основания с  $pK > 6$  (триэтиламин, *N*-метилморфолин) в данной системе позволяет ускорить ацилирование аминокислот. Так, реакция Z-Val-OH с изолейцином, где оба компонента являются пространственно затрудненными, завершается через 30 мин, в то время как в отсутствие третичного основания – только через 6 ч (рис. 2). Ранее было показано, что соотношение цвиттер-ионной и незаряженной форм аминокислот в апротонных растворителях находится в пределах от 2 до 40, в отличие от водных растворов, где это соотношение равно  $10^4$ – $10^5$  [5]. Этим можно объяснить возможность синтеза как производных аминокислот, так и пептидов в отсутствие третичного амина. Конденсация Z-Val-OH с изолейцином была выполнена с помощью TBTU-NOBT-, EDC-NOBT-методов и с помощью соответствующего пентафторфенилового эфира. В зависимости от метода конденсации реакция заканчивалась через 25–35 мин (рис. 2). Фактически возможно конденсировать любую аминокислотную пару с 80–99% выходами в такой системе, даже в случае пространственно затрудненных пар, например Z-Val-OH с пролином, Z-Val-OH с валином или Vos-Pro-OH с пролином (табл. 4). Кроме того, такие *N*-замещенные аминокислоты, как *N*-Me-лейцин не только прекрасно растворяются в этой системе, но и легко реагируют с ацилирующими агентами (табл. 4).

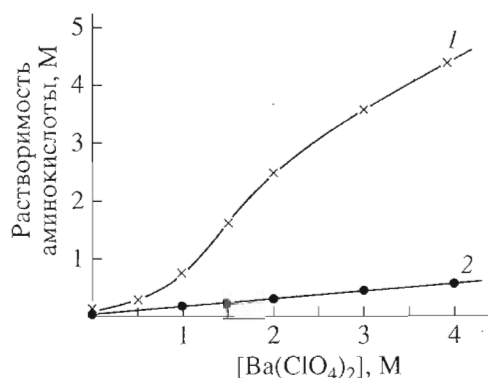


Рис. 1. Зависимость растворимости фенилаланина (1) и Tyr(Bzl) (2) от концентрации  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$  в системе растворителей  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ -DMF в присутствии TEA.

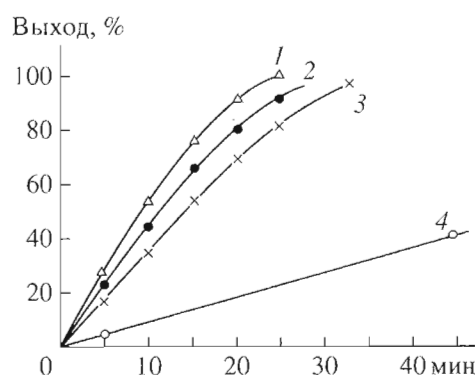


Рис. 2. Кинетика реакции Z-Val-OH с изолейцином, проведенной с помощью: TBTU-NOBT-метода (1); EDC-NOBT-метода (2); метода активированных эфиров через Z-Val-OPfp (3); EDC-NOBT-метода в отсутствие TEA (4) (см. "Эксперимент. часть").

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что для растворения аминокислот наиболее эффективной является система, состоящая из диметилформамида, нейтральной соли ( $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{CF}_3\text{COONa}$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{BaI}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) и триэтиламина. Аминокислоты, растворенные в такой системе, могут использовать-

Таблица 3. Производные триптофана, синтезированные в системе 3 М раствор неорганической добавки в DMF в присутствии TEA (1 ммоль на 1 ммоль аминокислоты)

Неорганическая добавка	Выход, %		
	Fmoc-Trp-OH	Vos-Trp-OH	Z-Trp-OH
$\text{CF}_3\text{COONa}$	96	96	97
$\text{NaClO}_4$	94	93	94
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	97	95	93
$\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$	96	95	96
$\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$	97	96	95
$\text{BaI}_2$	94	93	92

**Таблица 4.** Пептиды, синтезированные в системе 3 М раствор неорганической добавки в DMF в присутствии ТЕА (1 ммоль на 1 ммоль аминокислоты)

Ацилирующий агент	Аминокислота	Неорганическая добавка	Продукт реакции	Выход, %*	Т. пл., °С (лит. данные)
Z-Ala-OPfp	Phe	CF <sub>3</sub> COONa	Z-Ala-Phe-OH	96	125–127 (124–126 [15])
Z-Phe-OPfp	Phe	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Z-Phe-Phe-OH	94	158–159 (158–159 [16])
Z-Gly-OSu	Phe	NaClO <sub>4</sub>	Z-Gly-Phe-OH	99	126–128 (127–128 [17])
Z-Val-OBt <sup>2*</sup>	Ile	BaI <sub>2</sub>	Z-Val-Ile-OH	95	136–138 (136–138 [18])
Boc-Ala-OSu	Trp	BaI <sub>2</sub>	Boc-Ala-Trp-OH	93	177–180
Boc-Glu(OBzl)-OPfp	Phe	Ca(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Boc-Glu(OBzl)-Phe-OH <sup>4*</sup>	93	111–114
Z-Phe-OSu	Leu	BaI <sub>2</sub>	Z-Phe-Leu-OH <sup>4*</sup>	94	142–143 (141–142 [19])
Z-Phe-OBt <sup>2*</sup>	Ile	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Z-Phe-Ile-OH <sup>4*</sup>	97	122–123 (122–124 [20])
Boc-Tyr(Bzl)-OPfp	Gly	NaClO <sub>4</sub>	Boc-Tyr(Bzl)-Gly-OH	96	151–152 (151–152 [21])
Boc-Tyr(Bzl)-Gly-OBt <sup>3*</sup>	Gly	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OH	91	149–152
Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OBt <sup>3*</sup>	Phe	Ba(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-OH <sup>4*</sup>	95	94–96 (95–96 [22])
Z-Val-OSu	Pro	Ba(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Z-Val-Pro-OH	87	44 (42 [23])
Z-Pro-OBt <sup>3*</sup>	Val	NaClO <sub>4</sub>	Z-Pro-Val-OH <sup>4*</sup>	85	135–137 (134–136 [24])
Z-Gly-OPfp	Val	Ca(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Z-Gly-Val-OH <sup>4*</sup>	97	Масло
Z-Val-OSu	Val	CF <sub>3</sub> COONa	Z-Val-Val-OH <sup>4*</sup>	93	131–134 (132–134 [25])
Z-Ala-OBt <sup>3*</sup>	MeLeu	Ba(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Z-Ala-MeLeu-OH <sup>4*</sup>	87	Масло
Boc-Thr(Bzl)-OPfp	Ser(Bzl)	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-OH <sup>4*</sup>	96	Масло
Boc-Pro-OPfp	Pro	NaClO <sub>4</sub>	Boc-Pro-Pro-OH	83	185–186 (186–187 [26])
Boc-Asp(OBu <sup>1</sup> )-OPfp	Tyr(Bu <sup>1</sup> )	Ba(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Boc-Asp(OBu <sup>1</sup> )-Tyr(Bu <sup>1</sup> )-OH	91	156.5–157.5
Z-Gly-OSu	Glu(OBzl)	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Z-Gly-Glu(OBzl)-OH <sup>4*</sup>	94	95–97 (95–96.6 [27])
Z-Val-OPfp	Phe	CF <sub>3</sub> COONa	Z-Val-Phe-OH	92	175–177 (176–178 [28])

\* Выделенный продукт.

2\* С помощью TBTU-NOBt-метода.

3\* С помощью EDC-NOBt-метода.

4\* Очищали с помощью колоночной хроматографии (см. “Эксперимент. часть”).

ся в синтезе пептидов и производных аминокислот. В данной системе можно проводить также синтезы пептидов, исходя из свободных аминокислот, с помощью чувствительных к воде методов конденсации (TBTU-NOBt, EDC-NOBt) с высокими выходами.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали аминокислоты и их производные фирм Fluka (Швейцария) и Reanal (Венгрия). TBTU, NOBt, EDC · HCl фирмы Fluka. Диметилформамид перед использованием перегоняли в вакууме и хранили над молекулярными

ситами 4 Å. Все безводные неорганические добавки отечественного производства. Температуры плавления определяли на приборе фирмы Voetius (Германия) (не исправляли). Состав реакционных смесей и индивидуальность полученных соединений контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol UV 254 (Чехия) и Merck F 254 (Германия) в следующих системах растворителей: хлороформ–метанол–уксусная кислота, 90 : 10 : 1 (А) и бензол–диоксан–уксусная кислота, 90 : 25 : 4 (Б). Визуализацию проводили в УФ-свете при 254 нм и окрашиванием 0.2%-ым раствором нингидрина в этиловом спирте, а также толидиновым реактивом после хлорирования. Препаративную колоночную

хроматографию осуществляли на силикагеле L40/100 Chemapol (Чехия) в системе растворителей хлороформ–метанол, 95 : 1. ВЭЖХ проводили на хроматографе фирмы LKB (Швеция).

**Определение растворимости аминокислот.** Смесь 1 ммоль аминокислоты и 1 мл 3 М раствора неорганической добавки в DMF нагревали до 70–80°C, затем перемешивали 3 ч при комнатной температуре. К полученному раствору добавляли 0.14 мл (1 ммоль) ТЕА, перемешивали еще 1 ч. Нерастворившуюся часть отфильтровывали, промывали DMF и эфиром, сушили и взвешивали. Разность между взятой навеской и нерастворившимся остатком дает возможность определить растворимость, выражая ее в мг/мл и далее пересчитывая в моль/л (табл. 1).

**Типовая методика синтеза Fmoc-, Z- и Boc-производных аминокислот и пептидов в системе диметилформамид–неорганическая добавка–триэтиламин.** К раствору 1 ммоль аминокислоты в 1.5–3 мл 3 М раствора неорганической добавки в DMF (табл. 1) с ТЕА (1 ммоль) добавляли либо 0.8 ммоль Fmoc-OSu или Z-OSu, либо 2 ммоль Boc<sub>2</sub>O, либо 0.5 ммоль пентафторфенилового или N-оксисукцинимидного эфира Z- или Boc-N<sup>α</sup>-защищенной аминокислоты или пептида. Полученный раствор выдерживали при комнатной температуре 2 ч. Затем в реакционную смесь добавляли либо 5% HCl (для Z- и Fmoc-производных), либо 10% раствор лимонной кислоты (для Boc-производных) и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой и упаривали в вакууме. Полученный продукт кристаллизовали из этилацетата с гептаном либо очищали с помощью колоночной хроматографии (табл. 2–4).

**Типовая методика синтеза пептидов EDC-NOBt-методом в системе диметилформамид–неорганическая добавка–триэтиламин.** К смеси 1 ммоль аминокислоты или пептида и 1 ммоль NOBt в 2 мл DMF при перемешивании добавляли 1 ммоль EDC · HCl при 0°C. Выдерживали 30 мин при этой температуре. Затем добавляли раствор аминокислоты (2 ммоль) в 1.5–3 мл 3 М раствора неорганической добавки в DMF (табл. 1) с ТЕА (1 ммоль) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Далее обрабатывали полученную смесь и выделяли продукт (см. типовую методику синтеза Fmoc-, Z- и Boc-производных аминокислот и пептидов) (табл. 4).

**Типовая методика синтеза пептидов TBUTU-NOBt-методом в системе диметилформамид–неорганическая добавка–триэтиламин.** Смесь 1 ммоль аминокислоты или пептида, 1 ммоль NOBt, 1 ммоль TBUTU и 1 ммоль N-метилморфолина в 1.5 мл DMF перемешивали 20 мин при комнатной температуре. Затем добавляли раствор аминокислоты (2 ммоль) в 1.5–3 мл 3 М раствора неорганической добавки в DMF (табл. 1) с ТЕА (1 ммоль) и

перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Далее обрабатывали полученную смесь и выделяли продукт (см. типовую методику синтеза Fmoc-, Z- и Boc-производных аминокислот и пептидов) (табл. 4).

**Кинетику реакций Z-Val-OH и Z-Val-OPfp с изолейцином** анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Колонка SGX C18 Sepagor, 5 мкм, 3 × 150 мм, подвижная фаза – 60%-ный метанол с содержанием 0.1% TFA, скорость элюции 1 мл/мин, детекция при 254 нм.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-03-33169a).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miyazawa T., Otomatsu T., Fukui Y., Yamada T., Kuwata S. // Int. J. Peptide Protein Res. 1992. V. 39. P. 308–314.
2. Zervas L., Winitz M., Greenstein J.P. // J. Org. Chem. 1957. V. 22. P. 1515–1521.
3. Позднев В.Ф. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. С. 1605–1610.
4. Carpino L.A., Han G.Y. // J. Org. Chem. 1972. V. 37. P. 3404–3409.
5. Hughes D.L., Bergan J.J., Grabowski E.J.J. // J. Org. Chem. 1986. V. 51. P. 2579–2585.
6. Mitin Yu.V. // Int. J. Peptide Protein Res. 1996. V. 48. P. 374–376.
7. Ряднов М.Г., Каунарова Н. Я., Каунаров И.А., Митин Ю.В. // Биооргани. химия. 1998. Т. 24. С. 408–411.
8. Fujino M., Hatanaka C., Nishimura O. // Chem. Pharm. Bull. 1970. V. 18. P. 1288–1291.
9. Ali A., Fahrenheit F., Weinstein B. // Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1972. V. 11. P. 289.
10. Voelter W., Zech K., Grimminger W., Breitmaier E., Jung G. // Chem. Ber. 1972. V. 105. P. 3650–3657.
11. Smith E.L. // J. Biol. Chem. 1948. V. 175. P. 39–47.
12. Oki K., Suzuki K., Tachida S., Saito T., Kotake H. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1970. V. 43. P. 2554–2558.
13. Pande C.S., Rudick J., Walter R. // J. Org. Chem. 1970. V. 35. P. 1440–1443.
14. Chang C.-D., Waki M., Ahmad M., Meienhofer J., Lundell E.O., Haug G.D. // Int. J. Peptide Protein Res. 1980. V. 15. P. 59–66.
15. Barton M.A., Lemieux R.U., Savoie J.Y. // J. Am. Chem. Soc. 1973. V. 95. P. 4501–4506.
16. Cox R.E., Chexal K.K., Holker J.S.E. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1976. V. 1. P. 578–580.
17. Anderson G.W., Zimmerman J.E., Gallahan F.M. // J. Am. Chem. Soc. 1964. V. 86. P. 1839–1843.
18. Hardy P.M., Samworth D.J. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1977. V. 21. P. 1954–1960.
19. Pravda Z., Poduska K., Blaha K. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1964. V. 29. P. 2626–2630.

20. Miyoshi M. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1973. V. 4. P. 1489–1496.
21. Flouret G.R., Arnold W.H., Cole J.W., Morgan R.L., White W.F., Hedlund M.T., Rippel R.H. // J. Med. Chem. 1973. V. 16. P. 369–373.
22. Pietrzik E., Kalbacher H., Voelter W. // Justus Liebigs Ann. Chem. 1977. P. 609–613.
23. Stverteczky J., Bajusz S. // Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 1976. V. 88. P. 67.
24. Schröder E., Gibian H. // Ann. Chem. 1961. V. 649. P. 168–182.
25. Klieger E., Gibian H. // Ann. Chem. 1961. V. 649. P. 183.
26. Deber C.M., Bovey F.A., Carver J.P., Blout E.R. // J. Am. Chem. Soc. 1970. V. 92. P. 6191–6198.
27. Kienhuis H., Vandelinde A., J. van der Holst J.P., Verweij A. // Rec. Trav. Chim. 1961. V. 80. P. 1278.
28. Nicolaidis E., DeWald H., Westland R., Lipnik M., Poster J. // J. Med. Chem. 1968. V. 11. P. 74–77.

## An Effective Water-Free Aprotic System for Dissolving Free Amino Acids

M. G. Ryadnov, L. V. Klimenko, and Yu. V. Mitin<sup>#</sup>

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

An effective water-free system was proposed for dissolution and subsequent use in peptide synthesis of free amino acids and their derivatives. It consists of dimethylformamide, a tertiary base, and inorganic additives. Neutral salts ( $\text{CF}_3\text{COONa}$ ,  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{BaI}_2$ , or  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) serve as the inorganic additives that increase the solubility of free amino acids in dimethylformamide and provide true 0.2–3 M amino acid solutions. Triethylamine and *N*-methylmorpholine are most suitable as the tertiary bases. This system was used in reactions with acylating agents:  $\text{Boc}_2\text{O}$ , *Z*-OSu, Fmoc-OSu, and activated derivatives of  $N^\alpha$ -protected amino acids or peptides. The corresponding amino acid derivatives or  $N^\alpha$ -protected di-, tri-, and tetrapeptides were obtained in yields of 80–99% at the reaction times of 30–240 min.

*Key words: amino acids, amino acid derivatives, peptides, aprotic solvents*

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 924-0493; e-mail: mitin@vega.protres.ru.