



УДК 547.466.6:542.951.92

ГИДРОЛИЗ ПЕРВИЧНЫХ АМИДНЫХ ГРУПП В Asn/Gln-СОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДАХ

© 2000 г. В. В. Оноприенко[#], Э. А. Елин, А. И. МирошниковИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 13.01.2000 г. Принята к печати 14.02.2000 г.

Омыление пептидов $\text{Woc-Ala-Asn/Gln-OH}$ и $\text{Woc-Asn/Gln-Ala-OH}$ гидроксидом бария приводит к соответствующим Asp/Glu -содержащим пептидам. Пептид Woc-Asn-Ala-OH дополнительно образует при этом Woc-Asp-OH , изомеризация Woc-Asp(Ala)-OH и $\text{Woc-NHSuc} > \text{Ala-OH}$, причем последнее соединение является ключевым промежуточным продуктом при этих превращениях. Пептид $\text{Woc-Asp(OMe)-Ala-OMe}$ претерпевает аналогичные реакции при обработке диазометаном или триэтиламино. Омыление пептидов гидроксидом бария сопровождается сильной эпимеризацией N -концевых аминокислотных остатков, тогда как степень эпимеризации продуктов диазометановой обработки пептида $\text{Woc-Asp(OMe)-Ala-OMe}$ низка.

Ключевые слова: аспарагин; аспарагиновая кислота; глутамин; глутаминовая кислота; пептиды, эпимеризация, перегруппировка; первичные амиды, избирательное омыление.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что пространственные структуры (конформации) белков и больших (т.е. содержащих более 30 а. о.) пептидов в растворе определяются невалентными взаимодействиями: образованием водородных связей, электростатическими контактами заряженных групп и взаимодействием с молекулами растворителей. У более коротких пептидов конформация в растворе является менее определенной, но она зависит от тех же факторов. С другой стороны, биологически активные трехмерные структуры таких пептидов в наибольшей степени зависят от их невалентных взаимодействий с молекулами рецепторов. Остатки аспарагина и глутамина весьма интересны, так как их боковые цепи заканчиваются амидными группами и поэтому могут имитировать (особенно в случае аспарагина) основную пептидную цепь [1]. Геометрия остатков Asp и Glu аналогична геометрии остатков Asn и Gln , но отрицательные заряды карбоксильных групп при биологических значениях pH обеспечивают специфическое влияние этих остатков на структуру биологически активных пептидов и способность связывать некоторые катионы, например, Ca^{2+} [1].

Следовательно, весьма желательно иметь простой и эффективный метод дезамидирования остатков Asn и Gln в составе белков и пептидов, т.е.

Сокращения: DCNA – дициклогексилламин; HOBt – 1-гидроксибензотриазол; Nb – *n*-нитробензил; Np – *n*-нитрофенил.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-13-00; e-mail: onovv@ibch.siobc.ras.ru).

их превращения в остатки Asp и Glu . Такая трансформация могла бы обеспечивать новые возможности при экспериментальном изучении конформаций белков и пептидов и приводить к получению новых производных с усиленными или новыми биологическими свойствами.

Хорошо известны работы Сондхеймера и Холли [2, 3], в которых показано, что щелочная обработка сложных эфиров N^α -ацильных производных аспарагина и глутамина может приводить с высоким выходом к соответствующим циклическим имидам, раскрытие которых щелочами дает смеси частично или полностью рацемизованных моноамидов нормального и изостроения. Однако недавно описан пример химической модификации гликопептидного антибиотика эремодицина, существенной стадией которой было омыление первичной амидной функции в остатке Asn этого антибиотика с образованием соответствующего биологически активного Asp -производного [4]. Эти данные побудили нас начать исследование превращений Asn - и Gln -содержащих пептидов на примере простых дипептидных производных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве простейших дипептидов, пригодных для этой цели, мы выбрали соединения Woc-Asn-Ala-OH (IVa), Woc-Ala-Asn-OH (VIIa), Woc-Gln-Ala-OH (XIa) и Woc-Ala-Gln-OH (XIVa), которые синтезировали конденсацией *n*-нитрофениловых эфиров Woc-Asn-ONp (I), Woc-Ala-ONp (V) или Woc-Gln-ONp (IX) с соответствующими

Таблица 1. Синтез N^α-Вос-замещенных дипептидов

Исходные: аминокислота, активированный эфир или пептид	Исходный аминокислотный компонент или реагент	Продукт реакции	Выход, %	Т.пл., °С	R _f или RT	EI MS, m/z (I, %)
Вос-Asn-ONp (I)	TsOH · H-Ala-OBzl (II)	Вос-Asn-Ala-OBzl (III)	73	142–143	0.37 ^a	394 (1) [M + H] ⁺ , 340 (5.5), 203 (21), 189 (55)
(III)	H ₂ /Pd	Вос-Asn-Ala-OH (IVa)	93	190–191 (разл.)	0.48 ^b	
(IVa)	CH ₂ N ₂	Вос-Asn-Ala-OMe (IVb)	~100	масло	4.38 мин ^c	320 (10.7) [M + 3H] ⁺ , 303 (3.5), 264 (56), 229 (53), 184 (57), 131 (100)
Вос-Ala-ONp (V)	HBr · H-Asn-ONb (VI)	Вос-Ala-Asn-ONb (VII)	84	143–145	0.30 ^a	440 (5.6) [M + 2H] ⁺ , 384 (13), 366 (11), 282 (11), 233 (63), 214 (81), 144 (93), 136 (83)
(VII)	H ₂ /Pd	Вос-Ala-Asn-OH (VIIIa) ^d	77	Аморфное	0.33 ^b	
(VIIIa)	CH ₂ N ₂	Вос-Ala-Asn-OMe (VIIIb)	~100	масло	3.84 мин ^c	320 (3.9) [M + 3H] ⁺ , 303 (24), 300 (10), 278 (29), 246 (54), 227 (86), 200 (28), 144 (85), 127 (69)
Вос-Gln-ONp (IX)	TsOH · H-Ala-OBzl (II)	Вос-Gln-Ala-OBzl (X)	61	132–134.5	0.40 ^a	408 (5.5) [M + H] ⁺ , 353 (33), 336 (9), 218 (14), 202 (50), 201 (41), 145 (67), 101 (83)
(X)	H ₂ /Pd	Вос-Gln-Ala-OH (XIa)	~100	Аморфное	0.51 ^b	
(XIa)	CH ₂ N ₂	Вос-Gln-Ala-OMe (XIb)	~100	масло	4.52 мин ^c	334 (13) [M + 3H] ⁺ , 280 (83), 262 (45), 244 (53), 218 (39), 202 (83), 181 (74), 145 (93)
Вос-Ala-ONp (V)	TFA · H-Gln-OBzl (XII)	Вос-Ala-Gln-OBzl (XIII)	64	136–138	0.22 ^a	408 (29) [M + H] ⁺ , 352 (80), 336 (69), 310 (32), 294 (22), 277 (38), 267 (99), 264 (39)
(XIII)	H ₂ /Pd	Вос-Ala-Gln-OH (XIVa)	~100	Аморфное	0.48 ^b	
(XIVa)	CH ₂ N ₂	Вос-Ala-Gln-OMe (XIVb)	~100	масло	3.84 мин ^c	334 (6.9) [M + 3H] ⁺ , 280 (28), 262 (41), 244 (21), 215 (24), 202 (47), 187 (100), 144 (75)
Вос-Glu(OBzl)-OH · DCHA (XV)	TsOH · H-Ala-OBzl (II)	Вос-Glu(OBzl)-Ala-OBzl (XVI)	83	масло	0.55 ^e	500 (56) [M + 2H] ⁺ , 499 (47) [M + H] ⁺ , 498 (52) [M] ⁺ , 441 (78), 425 (51), 400 (29), 296 (76), 268 (50), 252 (52), 238 (76), 192 (93)
(XVI)	H ₂ /Pd	Вос-Glu-Ala-OH (XVII)	~100	масло	0.72 ^b	
(XVII)	CH ₂ N ₂	Вос-Glu(OMe)-Ala-OMe (XVIII)	~100	масло	0.15 ^g 8.41 мин ^h	349 (30) [M + 3H] ⁺ , 348 (31) [M + 2H] ⁺ , 294 (56), 278 (58), 263 (53), 244 (55), 234 (46), 217 (72), 211 (38), 188 (46), 181 (87), 159 (73), 116 (87)
Вос-Asp(OBzl)-OH (XIX)	TsOH · H-Ala-OBzl (II)	Вос-Asp(OBzl)-Ala-OBzl (XX)	79	масло	0.63 ^e	485 (16) [M + H] ⁺ , 484 (10) [M] ⁺ , 428 (52), 412 (51), 384 (4), 351 (16), 323 (82), 283 (82), 253 (34), 224 (88), 215 (62), 185 (82), 177 (100)
(XX)	H ₂ /Pd	Вос-Asp-Ala-OH (XXI)	~100	масло	0.56 ^b	
(XXI)	CH ₂ N ₂	Вос-Asp(OMe)-Ala-OMe (XXII)	~100	масло	0.56 ^f 11.46 мин ^h	336 (31) [M + 4H] ⁺ , 281 (37), 263 (61), 248 (69), 236 (18), 229 (48), 218 (55), 203 (67), 199 (65), 185 (58), 173 (47), 167 (60), 146 (76)

^a Хроматографическая система: CHCl₃-MeOH, 47 : 3. ^b Хроматографическая система: CHCl₃-90% MeOH-AsOH, 15 : 5 : 1. ^c Элюция 50% MeOH, 0.5 мл/мин. ^d Это вещество было очищено колоночной хроматографией на силикагеле (7.5 г) при элюции системой CHCl₃-90% MeOH-AsOH, 20 : 5 : 1. ^e Хроматографическая система: CHCl₃-MeOH, 49 : 1. ^f Хроматографическая система: бензол-эфир, 1 : 1, двойное проявление. ^g Хроматографическая система: бензол-эфир, 1 : 2. ^h Элюция 40% MeCN, 0.75 мл/мин.

Таблица 2. Омыление дипептидов (IVa), (VIIIa), (XIa) и (XIVa) насыщенным раствором Ba(OH)₂ при 37°C с последующей обработкой диазометаном (опыты 1–4) и превращения дипептида (XXII) и сукцинимидного производного (XXV) при обработке диазометаном или 1.5 М триэтиламино (опыт 5)

Номер опыта	Исходный дипептид	Время реакции, ч	Продукты реакции	Условия анализа	Выход, %	Условия идентификации
1	(VIIIa)	96 ^a	Вос-Ala-Asp(OMe)-OMe (XXIII) Вос-Ala-Asn-OMe (VIIIb)	ВЭЖХ ^b , RT 5.95 мин	59 20	EI MS ВЭЖХ и EI MS
2	(XIa)	42	Вос-Glu(OMe)-Ala-OMe (XVIII)	ВЭЖХ ^b , RT 8.41 мин	64	ТСХ, EI MS и сравнение с заведомым образцом
3	(XIVa)	42	Вос-Ala-Glu(OMe)-OMe (XXIV)	ВЭЖХ ^b , RT 7.58 мин	69	EI MS
4	(IVa)	40	Вос-Asp(OMe)-Ala-OMe (XXII) Вос-NHSuc>Ala-OMe (XXV) Вос-Asp(AlaOMe)-OMe (XXVI) Вос-Asp(OMe)-OMe (XXVII)	ТСХ ^c	11 20 38 12	ТСХ и EI MS; сравнение с заведомым образцом для соединения (XXII)
5	(XXII) ^{d, e} или (XXV) ^e	1 или 1.5–18	(XXII) (XXV) (XXVI)	ТСХ ^c	47 33 16	ТСХ и сравнение с образцами из опыта 4

^a После 40-часового гидролиза выход соединения (XXIII) составлял 31%, а степень конверсии исходного (VIIIa) была 50%.

^b Стеклоанальная колонка Separon SGX C18 (7 мкм, 3 × 150 мм); 50% MeOH, скорость потока 0.5 мл/мин; детекция при 210 нм.

^c Система: бензол–эфир, 3 : 2, тройное проявление. Значения *R_f*: (XXII) 0.52; (XXV) 0.44; (XXVI) 0.24 и (XXVII) 0.80.

^d ~0.7 М CH₂N₂ в смеси метанол–эфир при 30°C.

^e 1.5 М TEA в метаноле.

производными аминокислот TsOH·H-Ala-OBzl (II), HBr·H-Asn-ONb (VI) или TFA·H-Gln-OBzl (XII) в DMF в присутствии эквимольных количеств триэтиламина и HOBT с последующим гидрогенолизом бензильных защитных групп (см. “Эксперимент. часть” и табл. 1). Соответствующие метиловые эфиры (IVb), (VIIIb), (XIb) и (XIVb) были приготовлены обработкой карбоксилзамещенных дипептидов диазометаном.

Пептиды (IVa), (VIIIa), (XIa) и (XIVa) были подвергнуты омылению насыщенным (~0.2 М) раствором Ba(OH)₂ при 37°C в течение 40–96 ч, после чего реакционные смеси были освобождены от катионов избытком катионита Dowex 50 (H⁺), а образовавшиеся карбоксилсодержащие продукты метилированы диазометаном до соответствующих сложных эфиров и разделены с помощью ВЭЖХ или ТСХ. Результаты этих экспериментов (табл. 2), свидетельствуют о том, что дипептиды (VIIIa), (XIa) и (XIVa) гладко превращаются в соответствующие дипептидные производные аспарагиновой и глутаминовой кислот (XXIII), (XVIII) и (XXIV) (опыты 1–3), степень рацемизации которых будет обсуждена ниже. Во всех трех случаях мы наблюдали только один продукт реакции, но для полной уверенности подтвердили строение пептида (XVIII) встречным синтезом из Вос-Glu(OBzl)-OH·DCHA (XV) и TsOH·H-Ala-OBzl (II) (см. табл. 1 и “Эксперимент. часть”).

Однако щелочной гидролиз пептида (IVa) протекал не столь однозначно. Нам удалось выделить четыре продукта его превращения (XXII), (XXV), (XXVI) и (XXVII), которые приведены в табл. 2 (опыт 4) и на схеме 1. Структуры этих соединений были подтверждены данными масс-спектрометрии и аминокислотного анализа, а структура пептида (XXII) – также встречным синтезом из Вос-Asp(OBzl)-OH (XIX) и TsOH·H-Ala-OBzl (II) с последующим гидрогенолизом и обработкой диазометаном (см. табл. 1). Интересно отметить, что выходы сукцинимидного производного (XXV), изолепептида (XXVI) и даже диметилового эфира Вос-аспарагиновой кислоты (XXVII) превышали выход нормального Вос-дипептида (XXII). Механизм этой реакции, по-видимому, состоит в том, что первоначально при действии основания происходит отрыв протона от вторичной или первичной амидной группы, сопровождающийся циклизацией с отщеплением молекулы аммиака или аланина. При этом образуются промежуточные продукты (XXVIII) и (XXIX). Последний претерпевает щелочное раскрытие сукцинимидного кольца и дальнейшее омыление амидной группы и образует в конечном итоге диметиловый эфир Вос-аспарагиновой кислоты (XXVII) (выход 12%). Большая часть интермедиа (XXVIII) успеваеет подвергнуться щелочному гидролизу по связи а или б с образованием соответствующего нормального пептида (XXII) (вы-

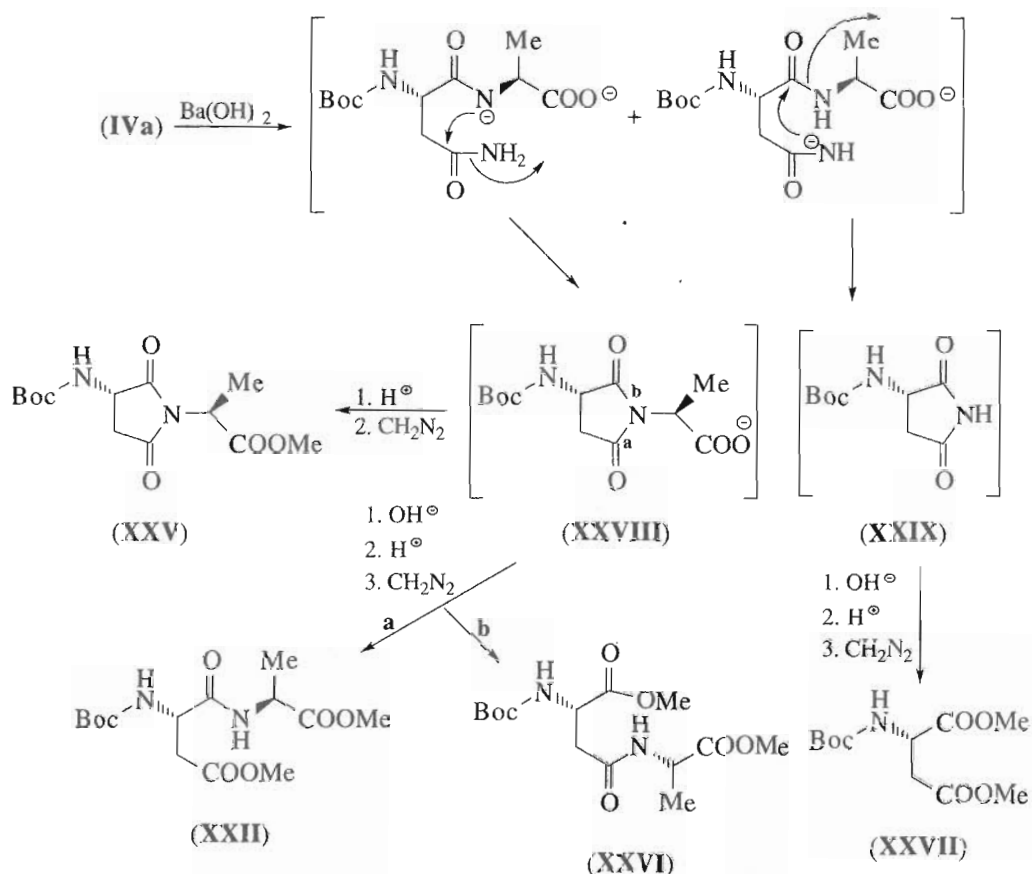


Схема 1. Щелочной гидролиз Boc-Asn-Ala-OH (IVa).

ход 11%) или изопептида (XXVI) (выход 38%). Оставшийся негидролизованным промежуточный продукт (XXVIII) в ходе обработки протонируется по карбоксильному аниону и метилируется диазометаном с образованием сукцинимидного производного (XXV) (выход 20%).

Чтобы дополнительно разобраться в механизме этих реакций, мы изучили некоторые превращения пептида Boc-Asp-Ala-OH (XXI) (см. схему 2). Так, его обработка избытком диазометана в смеси эфир-метанол (4 : 1) в течение 1 ч при 30°C приводит к образованию смеси продуктов (XXII), (XXV) и (XXVI); и только после трехминутной обработки диазометаном при 0°C пептид (XXI) образует почти исключительно диэфир (XXII). Мы также обнаружили, что использование метанола в качестве растворителя является еще одним условием этой изомеризации, так как в этилацетате аналогичная обработка пептида (XXI) эфирным раствором диазометана как в течение 4 мин при 0°C, так и в течение 1 ч при 30°C приводит исключительно к диэфиру (XXII). Однако такое более сильное основание как гидрид натрия (3-молярный избыток) в тетрагидрофуране обеспечивает превращение диэфира (XXII) в сукцинимидное производное (XXV) с выходом 60%.

Мы также изучили образование равновесной смеси соединений (XXII), (XXV) и (XXVI) непосредственно из диэфира (XXII) или сукцинимидного производного (XXV) (см. табл. 2, опыт 5). В этилацетате или диметилформамиде мы не наблюдали каких-либо превращений диэфира (XXII) в присутствии диазометана, тогда как 1.5 М триэтиламин в метаноле или избыток диазометана в смеси метанол-эфир вызывал образование этой равновесной смеси. Та же смесь образовывалась и при обработке сукцинимидного производного (XXV) 1.5 М триэтиламином в метаноле. Сопоставление этих фактов позволило нам предложить возможный механизм этих превращений, представленный на схеме 2. Первоначальное депротонирование амидной группы, для которого достаточно даже слабой основности 0.5–0.8 М диазометана, приводит к отщеплению метоксила и образованию сукцинимида (XXV). Последующее согласованное присоединение метанола (метоксила) по связи *a* или *b* дает соответственно изопептид (XXVI) или нормальный пептид (XXII).

Проблема эпимеризации α -хирального центра аминокислотных остатков – одна из важнейших в пептидной химии. Она детально рассмотрена в обзоре Д.С. Кемпа [5], который содержит бога-

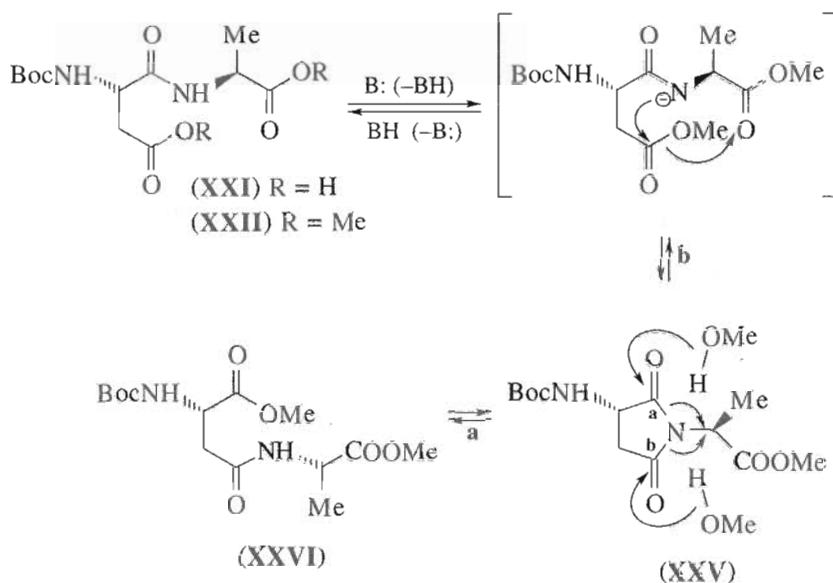


Схема 2. Изомеризация соединений (XXII) и (XXV) при действии оснований.

тейший материал по результатам ее изучения при различных методах конденсации, применяемых в пептидном синтезе. Однако методология анализа хиральной чистоты аминокислотных остатков пептидов, описанная в этом обзоре, претерпела революционное изменение в связи с введением капиллярных колонок с жидкой фазой Chirasil-Val, способных разделять в одном газохроматографическом опыте *D*- и *L*-энантимеры почти всех обычных аминокислот (ср., например, [6, 7]).

В соответствии с этой методикой мы изучили степень рацемизации аминокислотных остатков в

наших пептидах с помощью газовой хроматографии продуктов их обычного кислотного гидролиза 6 н. HCl в течение 24 ч при 106°C. Аминокислоты в полученных гидролизатах подвергали газовой хроматографии в виде *N*-трифторацетильных производных метиловых эфиров. Степень рацемизации (*R*) того или иного аминокислотного остатка вычисляли по формуле:

$$R = 200A_D / (A_D + A_L), \%$$

где A_D и A_L – площади пиков *D*- и *L*-энантимеров соответствующего аминокислотного производного.

Таблица 3. Степень рацемизации (*R*, %) аминокислотных остатков в пептидах (условия газовой хроматографии см. в “Эксперимент. части”)

Номер опыта	Пептид	Ala ^a	Asp ^b	Glu ^c
1	Продукты Ba(OH) ₂ -гидролиза пептида Boc-Asn-Ala-OH (IVa)	3.0	54.0	–
2	Boc-Asn-Ala-OH (IVa)	2.4	5.7	–
3	Продукты энергичной обработки диазометаном пептида Boc-Asp(OMe)-Ala-OMe (XXII) ^d	2.1	6.2	–
4	Boc-Ala-Asp(OMe)-OMe (XXIII) ^e	46	10	–
5	Boc-Ala-Asn-OH (VIIIa)	2.2	4.7	–
6	Boc-Glu(OMe)-Ala-OMe (XVIII) ^e	2.1	–	21.9
7	Boc-Gln-Ala-OH (XIa)	2.0	–	2.9
8	Boc-Ala-Glu(OMe)-OMe (XXIV) ^e	14.9	–	4.5
9	Boc-Ala-Gln-OH (XIVa)	1.6	–	3.1

^a RT 7.56 мин (*D*) и 8.27 мин (*L*).

^b RT 16.86 мин (*D*) и 17.09 мин (*L*).

^c RT 20.92 мин (*D*) и 21.42 мин (*L*).

^d 0.8 M CH₂N₂ в смеси эфир–метанол, 4 : 1, 1 ч при 30°C.

^e Получен Ba(OH)₂-гидролизом и последующим метилированием диазометаном (см. табл. 2).

Как можно видеть из табл. 3, синтетические пептиды (IVa), (VIIa), (XIa) и (XIVa) (опыты 2, 5, 7 и 9) имели достаточно низкую степень рацемизации и их обработка диазометаном (в качестве примера см. опыт 3) на рацемизацию практически не влияла. Однако в полном соответствии с данными, приведенными в обзоре [5], щелочная обработка этих пептидов приводила к сильной рацемизации *N*-концевых остатков и существенно слабее влияла на рацемизацию *C*-концевых остатков. Особенно высокая степень рацемизации *N*-концевых аминокислотных остатков (до 46–54%) наблюдалась у продуктов омыления Asp-содержащих пептидов (IVa) и (XXIII) (опыты 1 и 4), тогда как Gln-содержащие пептиды (XVIII) и (XXIV) после омыления имели степень рацемизации 13–22% (опыты 6 и 8). Можно также отметить, что в ходе омыления и *C*-концевые остатки у Asp-содержащих пептидов рацемизовались сильнее, чем у пептидов, содержащих Gln-остаток (ср. опыты 1 и 4 с опытами 6 и 8).

ВЫВОДЫ

Таким образом, в результате проведенного изучения реакции омыления гидроксидом бария Asp- и Gln-содержащих дипептидов мы установили, что оба аминокислотных остатка, входящих в эти дипептиды, претерпевают рацемизацию, особенно сильную для Asp-содержащих пептидов. Кроме того, в случае *N*-концевого аспарагина реакция омыления сопровождается образованием сукцинимидного производного, следствием чего является расщеление пептидной цепи и образование Asp-содержащего изодипептида. Тем не менее, омыление гидроксидом бария Gln-содержащих пептидов при особых обстоятельствах может быть приемлемым методом их модификации, тогда как омыление Asp-содержащих пептидов едва ли может оказаться полезным. Для таких пептидов наши результаты открывают, однако, другую возможность: изомеризацию Asp-Хаа-пептидов до Asp(Хаа)-изопептидов при действии оснований; в специфических случаях такое превращение может оказаться интересным.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аминокислотные производные Boc-Asp-ONp (I), Boc-Ala-ONp (V), гидробромид Asp-ONb (VI), Boc-Gln-ONp (IX) и дициклогексиламмониевая соль Boc-Glu(OBzl)-OH (XV) были получены у фирмы "Reanal" (Венгрия); тозилат Ala-OBzl (III) был произведен в НПО ИРЕА (Россия).

Температуры плавления измерены на микронагревательном столике Востис (Германия) и не исправлены. Для колоночной хроматографии применяли силикагель 60 (40–53 мкм, Merck). ТСХ осуществляли на готовых пластиках с на-

несенным слоем силикагеля 60 F₂₅₄ (Merck). Пятна веществ обнаруживали в УФ-свете или опрыскиванием пластинок 0.8% KMnO₄, конц. H₂SO₄ или стандартным раствором нингидрина. Для ВЭЖХ применяли модульный прибор Pye Unicam, состоящий из насоса LC-XPД, детектора LC-UV и инжектора Rheodyne. Разделения проводили на стеклянной колонке Separon SGX C18 (7 мкм, 3 × 150 мм, Tessek, Чехия); продукты, если не указано особо, элюировали 50% метанолом со скоростью 0.5 мл/мин; детекцию проводили при 210 нм.

Для газовой хроматографии применяли капиллярный газовый хроматограф фирмы Carlo Erba 5360 (Италия), снабженный пламенно-ионизационным детектором, инжектором с прямым вводом в колонку и кварцевой колонкой Chirasil-Val (толщина слоя фазы 0.15 мкм, внутренний диаметр 0.3 мм и длина 50 м). В качестве газа-носителя использовали водород при входном давлении 105 кПа. Анализ проводили с использованием линейной температурной программы от 50 до 200°C со скоростью 5°C/мин.

Масс-спектры при ионизации электронным ударом (EI MS, 70 эВ) получены на приборе Varian MAT 44 при прямом вводе образца в ионный источник. Масс-спектры плазменной десорбции (PD MS) измерены на масс-спектрометре, произведенном в г. Сумы (Украина), при ионизации продуктами распада ²⁵²Cf.

Трифторацетат бензилового эфира глутамина (XII). Boc-Gln-OH был получен из глутамида по методике [8] (т. пл. 119–120°C, лит. 116–118°C [9]) и превращен в Boc-Gln-OBzl (т. пл. 110–112°C, лит. 109–110°C [10]) как описано в работе [10]. Раствор 1.4 г (4.17 ммоль) Boc-Gln-OBzl в 11 мл TFA выдерживали 30 мин при 24°C и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали при –12°C, растирали с эфиром и отфильтровывали. Выход 1.097 г (75%); т. пл. 105.5–107°C; R_f 0.20 (хлороформ–90% MeOH–AcOH, 20 : 5 : 1); PD MS, *m/z*: 237 [M + H]⁺, где *M* – молекулярная масса Gln-OBzl.

Получение *N*^α-Boc-замещенных дипептидов из *n*-нитрофениловых эфиров *N*^α-Boc-аминокислот (общая методика). *N*-Boc-производное *n*-нитрофенилового эфира аланина, аспарагина или глутамина (0.55 ммоль) и *n*-толуолсульфонат, трифторацетат или гидробромид бензилового или *n*-нитробензилового эфира аминокислоты (0.50 ммоль) (см. табл. 1) растворяли в безводном DMF (2 мл) и обрабатывали триэтиламино (0.50 ммоль) и HOBt (0.50 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 24 ч при комнатной температуре, упаривали в вакууме, и остаток растворяли в смеси этилацетат–диэтиловый эфир, 1 : 1. Раствор последовательно промывали водой, 1 н. HCl, насыщенным раствором NaHCO₃ и водой, сушили безводным сульфатом натрия и упаривали. Остаток кристаллизовали затиранием с диэтиловым эфиром, кристаллы отфильтровывали, промывали эфиром и

сушили в вакууме. Образовавшиеся *N*-Вос-замещенные бензиловые или *n*-нитрофениловые эфиры (III), (VII), (X) и (XIII) (0.25 ммоль), не содержавшие примеси *n*-нитрофенола, растворяли в 2 мл метанола и прибавляли к катализатору (37 мг 10% PdO/C, предварительно гидрированного в 3 мл метанола при комнатной температуре и атмосферном давлении) и гидрогенизировали в течение 3 ч. Затем катализатор отфильтровывали и промывали метанолом, а фильтраты упаривали. Получали хроматографически чистые дипептиды (IVa), (VIIIa), (XIa) и (XIVa), которые дополнительно характеризовали в виде метиловых эфиров (IVb), (VIIIb), (XIb) и (XIVb), приготовленных действием 0.6–0.8 М эфирного раствора диазометана на метанольные растворы этих дипептидов в течение 1 ч при 30°C (см. табл. 1).

Вос-Asp(OBzl)-Ala-OBzl (XX). Вос-Asp(OBzl)-ОН (XIX) (161.5 мг, 0.5 ммоль; получен по методике, приведенной в [9]) и *n*-TsOH · H-Ala-OBzl (II) (175.5 мг, 0.5 ммоль) растворяли в 2 мл безводного DMF и обрабатывали 50.5 мг (0.5 ммоль) триэтиламина, 67.5 мг (0.5 ммоль) HOBt и 113 мг (0.5 ммоль) DCC при 0°C. Реакционную смесь медленно нагревали до 30°C, выдерживали 3 ч при этой температуре и 16 ч при 5°C, после чего отфильтровывали от выпавшего осадка дициклогексилмочевины. Осадок промывали этилацетатом, а объединенные фильтраты упаривали до небольшого объема и разбавляли смесью этилацетат–диэтиловый эфир. Полученный раствор промывали 1 н. HCl, водой, насыщенным раствором NaHCO₃ и снова водой, сушили безводным сульфатом натрия и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (8 г), элюируя смесью хлороформ–метанол, 49 : 1. Получили 191.5 мг (79%) чистого дипептида (XX), характеристики которого приведены в табл. 1.

Вос-Asp-Ala-ОН (XXI) и Вос-Asp(OMe)-Ala-OMe (XXII) были получены гидрогенилизом дибензилового производного (XX) с последующей обработкой образовавшегося дипептида (XXI) диазометаном (3 мин при 0°C в смеси эфир–метанол, 4 : 1 или 4 мин при 0°C в этилацетате) по методикам, описанным выше.

Вос-Glu(OBzl)-Ala-OBzl (XVI), Вос-Glu-Ala-ОН (XVII) и Вос-Glu(OMe)-Ala-OMe (XVIII). Суспензию кристаллической дициклогексиламмониевой соли Вос-Glu(OBzl)-ОН (XV) (259.4 мг, 0.5 ммоль) в 3 мл этилацетата встряхивали с 0.6 мл 1 н. NaHSO₄ до полного исчезновения осадка. Водный слой отделяли и трижды экстрагировали этилацетатом, а объединенный органический слой промывали водой, сушили безводным сульфатом натрия и упаривали. Полученный маслообразный Вос-Glu(OBzl)-ОН (выход 91%) конденсировали с производным (II) по вышеописанной методике, а образовавшийся дибензиловый эфир дипептида (XVI) далее превращали гидрогенилизом в дипептид (XVII) и затем в диметиловый эфир (XVIII)

(обрабатывая диазометаном дипептид (XVII) в течение 3 мин при 0°C или в течение 1 ч при 30°C в смеси эфир–метанол, 4 : 1) (см. табл. 1).

Омыление пептидов гидроксидом бария. Дипептидное производное (IVa), (VIIIa), (XIa) или (XIVa) (10 мкмоль) растворяли в 0.3 мл насыщенного раствора Ba(OH)₂, и раствор выдерживали при 37°C в течение времени, указанного в табл. 2. Затем его обрабатывали катионитом Dowex 50 (H⁺-форма) при комнатной температуре, доводя pH до ~2–3, и отфильтровывали. Смола промывали дистиллированной водой и спиртом, а объединенный фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в метаноле (200 мкл), раствор обрабатывали избытком диазометана (800 мкл ~0.6–0.8 М эфирного раствора) и выдерживали в течение 3 мин при 0°C в случае пептида (IVa) или в течение 1 ч при 30°C в случае пептидов (VIIIa), (XIa) или (XIVa). Продукты этих реакций анализировали, разделяли препаративной ТСХ или ВЭЖХ и идентифицировали как указано в табл. 2:

Вос-Ala-Asp(OMe)-OMe (XXIII); ВЭЖХ: RT 5.95 мин; EI MS, *m/z* (*I*, %): 336 (13) [*M* + 4H]⁺, 335 (25) [*M* + 3H]⁺, 334 (28) [*M* + 2H]⁺, 333 (28) [*M* + H]⁺, 332 (28) [*M*]⁺, 305 (27), 302 (27), 288 (33), 280 (40), 263 (68), 242 (32), 239 (100), 237 (64), 203 (6), 160 (12), 144 (35), 128 (12), 113 (14).

Вос-Glu(OMe)-Ala-OMe (XVIII); ВЭЖХ: RT 8.41 мин; ТСХ: R_f 0.15 (бензол–эфир, 1 : 2); EI MS, *m/z* (*I*, %): 349 (30) [*M* + 3H]⁺, 348 (31) [*M* + 2H]⁺, 294 (56), 278 (58), 263 (53), 244 (55), 234 (46), 217 (72), 211 (38), 188 (46), 181 (87), 159 (73), 116 (87).

Вос-Ala-Glu(OMe)-OMe (XXIV); масло; ВЭЖХ: RT 7.58 мин; EI MS, *m/z* (*I*, %): 348 (6.3) [*M* + 2H]⁺, 347 (2.1) [*M* + H]⁺, 346 (1.0) [*M*]⁺, 295 (60), 278 (79), 264 (51), 244 (24), 234 (37), 217 (59), 215 (51), 203 (68), 187 (38), 181 (44), 174 (70), 160 (21), 144 (84), 142 (87).

Вос-Asp(OMe)-Ala-OMe (XXII); масло; ВЭЖХ (40% MeOH, 0.75 мл/мин): RT 11.46 мин; ТСХ: R_f 0.56 (бензол–эфир, 1 : 1, двойное проявление); R_f 0.52 (бензол–эфир, 3 : 2, тройное проявление); EI MS, *m/z* (*I*, %): 336 (31) [*M* + 4H]⁺, 281 (37), 263 (61), 248 (69), 236 (21), 229 (48), 218 (55), 203 (67), 199 (65), 185 (58), 173 (47), 167 (60), 146 (76).

Вос-NHSc > Ala-OMe (XXV); масло; ТСХ: R_f 0.63 (бензол–эфир, 1 : 1, двойное проявление); R_f 0.44 (бензол–эфир, 3 : 2, тройное проявление); EI MS, *m/z* (*I*, %): 304 (28) [*M* + 4H]⁺, 303 (14) [*M* + 3H]⁺, 274 (4), 260 (8), 244 (74), 229 (84), 214 (77), 201 (71), 195 (71), 185 (79), 172 (47), 167 (83), 140 (72).

Вос-Asp(AlaOMe)-OMe (XXVI); масло; ТСХ: R_f 0.33 (бензол–эфир, 1 : 1, двойное проявление); R_f 0.24 (бензол–эфир, 3 : 2, тройное проявление); EI MS, *m/z* (*I*, %): 335 (21) [*M* + 3H]⁺, 334 (14) [*M* + 2H]⁺, 304 (6), 278 (99), 263 (94), 248 (77), 229 (69), 219 (83), 200 (67), 185 (57), 173 (96), 167 (61), 145 (71).

Вос-Asp(OMe)-OMe (XXVII); масло; ТСХ: R_f 0.80 (бензол–эфир, 3 : 2, тройное проявление);

EI MS, m/z (I , %): 204 (23) [$M - Bu^+$], 203 (26) [$M - COOCH_2^+$], 189 (7), 174 (13), 160 (25), 146 (52), 128 (12), 113 (12), 103 (100).

Трансформации диметилового эфира (XXII).

а. Обработка CH_2N_2 . К раствору 3.32 мг (10 мкмоль) эфира (XXII) в 0.2 мл метанола прибавляли 0.8 мл ~0.7 М раствора CH_2N_2 в эфире, смесь выдерживали в течение 1 ч при 30°C и упаривали. Остаток разделяли препаративной ТСХ в системе бензол-эфир, 3 : 2 (тройное проявление). Из зон с R_f 0.52, 0.44 и 0.24, соответственно, элюировали исходный эфир (XXII) (1.56 мг, 47%), сукцинимидное производное (XXV) (0.99 мг, 33%) и изопептид (XXVI) (0.54 мг, 16%).

б. Обработка NEt_3 . К раствору 3.32 мг (10 мкмоль) эфира (XXII) в 0.2 мл метанола прибавляли 29 мг (0.29 ммоль) триэтиламина, и смесь выдерживали 1.5 ч при 30°C. Получали такую же смесь продуктов как и в опыте а. При проведении этой реакции в этилацетате или DMF исходный эфир (XXII) не изменялся.

в. Обработка NaN . К раствору 3.32 мг (10 мкмоль) эфира (XXII) в 0.4 мл безводного THF прибавляли 1.0 мг 75% суспензии гидрида натрия в парафиновом масле, смесь перемешивали 1 ч при 30°C и разлагали 20 мкл уксусной кислоты. Продукт реакции выделяли препаративной ТСХ. Из основной зоны элюировали 1.82 мг (60%) сукцинимидного производного (XXV).

Трансформации сукцинимидного производного (XXV). Раствор 1.5 мг (5 мкмоль) сукцинимидного производного (XXV) в 0.1 мл метанола обрабатывали триэтиламинол в условиях опыта б предыдущего эксперимента, в результате чего получали ту же смесь продуктов, как и в опытах а и б. При увеличении продолжительности опыта до 18 ч соотношение продуктов не изменялось.

Кислотный гидролиз пептидов и приготовление образцов для ГХ. Образцы пептидов гидролизovali 6 н. HCl в запаянных эвакуированных ампулах в течение 24 ч при 106°C и гидролизаты упаривали в вакууме. Остаток последовательно обрабатывали 4 н. HCl в метаноле (2 ч при 60°C) и 10% раствором трифторуксусного ангидрида в хлороформе (15 мин при комнатной температуре). Затем образцы анализировали ГХ как указано выше.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим М.Н. Преображенскую за препринт ее публикации [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Richardson J.S., Richardson D.C. // Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation / Ed. G.D. Fasman. New York, London: Plenum Press, 1989. P. 1-98.
2. Sondheimer E., Holley R.W. // J. Am. Chem. Soc. 1954. V. 76. P. 2467-2470.
3. Sondheimer E., Holley R.W. // J. Am. Chem. Soc. 1957. V. 79. P. 3767-3770.
4. Olsufyeva E.N., Berdnikova T.F., Miroshnikova O.V., Reznikova M.I., Preobrazhenskaya M.N. // J. Antibiotics. 1999. V. 52. P. 319-324.
5. Kemp D.S. // The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 1. / Eds E. Gross, J. Meienhofer. N. Y.: Academic, 1979. P. 315-383.
6. Frank H., Nicholson G.J., Bayer E. // J. Chrom. 1978. V. 146. P. 197-206; 1978. V. 167. P. 187-196.
7. Frank H., Woiwode W., Nicholson G., Bayer E. // Liebig's Ann. Chem. 1981. P. 354-365.
8. Позднев В.Ф. // Химия природ. соед. 1979. № 4. С. 543-548.
9. Гершкович А.А., Кубирев В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наукова думка, 1987.
10. Ono N., Yamada T., Saito T., Tanaka K., Koji A. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1978. V. 51. P. 2401-2404.

The Hydrolysis of Primary Amide Groups in Asn/Gln-containing Peptides

V. V. Onoprienko[#], E. A. Yelin, and A. I. Miroshnikov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Peptides Boc-Ala-Asn/Gln-OH and Boc-Asn/Gln-Ala-OH were saponified with barium hydroxide to corresponding Asp/Glu-containing peptides. Under the conditions of saponification, Boc-Asn-Ala-OH additionally afforded Boc-Asp-OH, isopeptide Boc-Asp(Ala)-OH, and Boc-NHSuc > Ala-OH, with the third being the key intermediate in these transformations. Boc-Asp(OMe)-Ala-OMe underwent similar transformations under treatment with diazomethane or triethylamine. Saponification with barium hydroxide was accompanied by a high epimerization of *N*-terminal amino acid residues, whereas the products of the diazomethane treatment of Boc-Asp(OMe)-Ala-OMe had a low degree of epimerization.

Key words: asparagine; aspartic acid; glutamine; glutamic acid; peptides, epimerization; primary amides, selective saponification, rearrangement

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-1300; e-mail: onovv@ibch.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 6. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.