



УДК 547.466.07 + 542.95

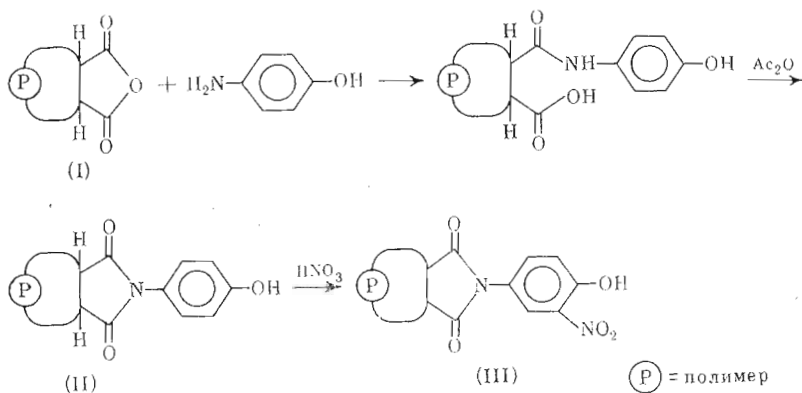
МАКРОСЕТЧАТЫЙ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ
СУКЦИНИМИДОНИТРОФЕНОЛ В ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ*Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М.,
Мрачковская Т. А.**Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва*

Путем модификации макросетчатого сополимера стирола и малеинового ангидрида *n*-аминофенолом и последующим нитрованием синтезирован нерастворимый поли-*n*-сукцинимидо-*o*-нитрофенол, используемый в качестве активатора карбоксильных групп в пептидном синтезе. Введение в полимер *N*-защищенных аминокислот (Gly, Pro, Leu, Cys(Bzl), Phe) дициклогексилкарбодимидным методом приводит к образованию полимерных активированных эфиров. Указанные реагенты использованы в синтезе ряда модельных ди- и трипептидов. Показано, что *n*-сукцинимидо-*o*-нитрофенол можно применять для пептидного синтеза в растворе.

Использование полимеров для активации карбоксильных групп аминокислот и пептидов с целью образования пептидной связи имеет известные преимущества по сравнению с классическими методами пептидного синтеза, что связано главным образом с увеличением выходов и большей чистотой синтезируемых продуктов [1, 2]. В качестве таких полимеров часто использовали высокомолекулярные нитрофенолы, получаемые на основе полистирольных каркасов [3—6].

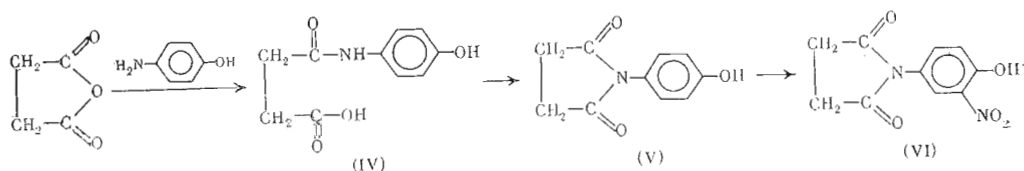
Ранее [7—8] мы сообщили о применении для синтеза пептидов полимерного *N*-оксисукцинимида, получаемого на основе изпористых макросетчатых сферически гранулированных сополимеров малеинового ангидрида с винильными мономерами. Такой полимер обладал хорошей химической и механической стабильностью, набухаемостью в различных средах и хорошо зарекомендовал себя в пептидном синтезе.

В настоящей работе на основе такого полимерного каркаса мы получили новый полимер-активатор с нитрофенольной активирующей функцией. Синтез его осуществлен по следующей схеме:



Исходный сополимер стирола и малеинового ангидрида (1), спитый бензидином или диаминодифенилоксидом [7], вводили в реакцию с *n*-аминофенолом в среде ДМФА* при 95—100°, затем полимер обрабатывали укусным ангидридом при комнатной температуре и нитровали азотной кислотой.

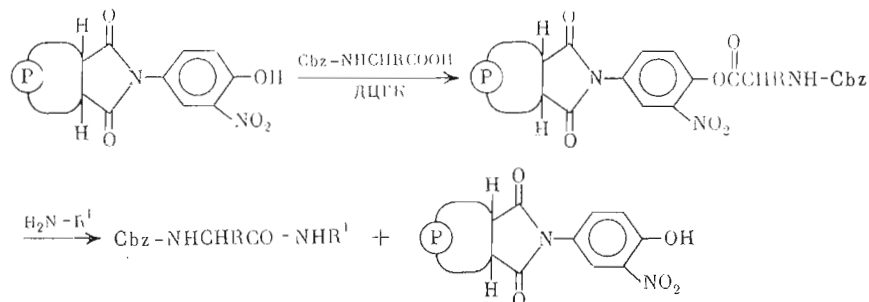
Для оптимизации условий получения указанного полимера (III) и проверки реакционной способности получаемых на его основе активированных эфиров *N*-защищенных аминокислот были проведены модельные эксперименты на низкомолекулярных производных. Так, оказалось, что при взаимодействии янтарного ангидрида с *n*-аминофенолом в ДМФА при 80—95° образуется в основном *n*-оксибензиламид янтарной кислоты (ИК-спектр: 3200 (ОН), 1660 (СО-НН) и 1700 см⁻¹ (СООН)). После обработки сукцинимидом укусным ангидридом при комнатной температуре в ИК-спектре выделенного продукта исчезает поглощение амида и свободного карбоксила и появляются две новые полосы в области 1775 и 1690 см⁻¹, характерные для циклического имида. При этом ацилирования фенольного гидроксила не происходит:



Следует отметить, что при нагревании янтарного ангидрида с *n*-аминофенолом в ДМФА при 140° протекает сразу же и дегидроконденсация с образованием *n*-сукцинимидофенола (V), однако при этом наблюдается значительное осмоление реакционной смеси. Нитрование соединения (V) разбавленной азотной кислотой при комнатной температуре приводит к мононитросукцинимидофенолу (VI).

Низкомолекулярные *n*-сукцинимидонитрофеноловые эфиры Вос-глицина и Вос-пролина, использованные в качестве модельных соединений, были получены с помощью ДЦГК как конденсирующего агента. Полученные сложные эфиры — кристаллические соединения, хорошо растворимые в органических растворителях (ДМФА, тетрагидрофуран, хлористый метилен), ИК-спектр их содержит характерные полосы в области 1780 и 1710 см⁻¹. Аминолиз их эфиром глицина в ДМФА в течение нескольких часов приводит к дипептидам с выходами ~ 90%. Выделяющийся в процессе реакции *n*-сукцинимидонитрофенол практически нерастворим в слабополярных растворителях, но хорошо растворяется в ДМФА.

Использование полимерного сукцинимидонитрофенола в пептидном синтезе иллюстрируется схемой



R¹ = остаток аминокислоты
или пептида

* Используемые сокращения: ДМФА — диметилформамид, Cbz — бензилоксикарбонил, Вос — *tert*-бутилоксикарбонил, Bzl — бензил, Pht — фталил, ДЦГК — дициклогексилкарбодимид.

Таблица 1

Полимерные сукцинимидонитрофениловые эфиры N-защищенных аминокислот

N-Защищенная аминокислота	Содержание аминокислоты в полимере, ммоль/г	Выход, %	N-Защищенная аминокислота	Содержание аминокислоты в полимере, ммоль/г	Выход, %
Cbz-Gly	1,73	94	Cbz-Cys (Bzl)	1,40	93
Cbz-Pro	1,34	74	Pht-Phe	1,56	99
Boc-Leu	1,22	60			

Таблица 2

Пептиды, синтезированные с применением полимерного сукцинимидонитрофенола

Синтезированный пептид *	Выход, %		Т. пл., °С	[α] _D ²⁵ , град
	сырой	после перекристаллизации		
Cbz-Pro-Leu-OMe	87	57	76–77	–77,0 (с 1; MeOH)
Boc-Leu-Gly-OEt	93	93	79,5–81	
Cbz-Pro-Leu-Gly-OEt	92,5	83,2	152	–80 (с 2,5; EtOH)
Cbz-Gly-Gly-OEt	85	85	80–80,5	
Cbz-Cys(Bzl)-Gly-OEt	91	78	97–98	–26,7 (с 6; AcHO)

* Все аминокислоты L-ряда.

Присоединение N-защищенных аминокислот к полимеру-активатору осуществляли ДЦГК-методом в среде ДМФА в условиях высоких концентраций реагирующих компонентов при 0°. Выходы полимерных эфиров и содержание аминокислот в полимере, определяемых по привесу полимерного продукта, приведены в табл. 1.

Для образования пептидной связи (см. табл. 2) полученный полимерный эфир (1–2 экв.) вводили во взаимодействие с эфиром аминокислоты или пептида (1 экв.) в ДМФА при комнатной температуре в течение 12–24 ч. После отделения полимера фильтрованием и стандартной обработки фильтрата (см. «Экспер. часть») получали хроматографически чистые продукты с хорошими выходами.

Экспериментальная часть

ДМФА очищали по известной методике [9]. Макросетчатый сополимер стирола и малеинового ангидрида получали, как описано ранее [7]. Производные аминокислот использовались фирмы «Reanal» (Венгрия). ИК-спектры снимались в виде таблеток с KBr на приборе UR-10 (ГДР), УФ-спектры — на приборе Specord UV-VIS (ГДР).

Полимерный сукцинимидонитрофенол (III). Суспензию 20 г сферически гранулированного (0,1–0,3 мм) сополимера стирола и малеинового ангидрида, сшитого 4 мол. % бензидина [7], в растворе 32 г *n*-аминофенола в 120 мл сухого ДМФА перемешивали 3 ч при 95–100°. Затем полимер отфильтровывали, промывали ДМФА, водой, 0,6 н. HCl, водой, ацетоном, выдерживали 1 ч в смеси ацетон — уксусный ангидрид (2 : 1), после чего промывали ацетоном, эфиром и сушили в вакууме; выход 27,7 г. Найдено, %: N 4,62. Вычислено, %: N 4,93.

Нитрование предварительно набухшего в диоксане полисукцинимидо-фенола проводили путем перемешивания полимера в азотной кислоте (*d* 1,30) в течение 18 ч при комнатной температуре. Полимер отфильтровывали, промывали попеременно водой, диоксаном и ДМФА, затем ацетоном, эфиром и сушили в вакууме. Найдено, %: N 7,45. Вычислено, %: N 8,05. ИК-спектр: 1550, 1715, 1780 сл., 3200—3500 см⁻¹.

n-Оксифениламид янтарной кислоты (IV). Раствор 5 г янтарного ангидрида и 5,45 г *n*-аминофенола в 15 мл ДМФА перемешивали в течение 3 ч при 85°. Затем реакционную смесь упаривали в вакууме и оставшееся темное масло обрабатывали хлороформом. Выпавший осадок отфильтровывали, тщательно промывали хлороформом и перекристаллизовывали из ацетона. Выход 6,4 г (66%); т. пл. 176°. ИК-спектр: 1620, 1660, 1700, 3200 см⁻¹. Найдено, %: C 57,20; H 5,13; N 6,52. Вычислено, %: C 57,36; H 5,30; N 6,69.

n-Сукцинимидофенол (V). Метод А. Раствор 27,2 г соединения (IV) и 150 мл уксусного ангидрида в 200 мл ДМФА выдерживали 3 ч при комнатной температуре. Затем раствор упаривали в вакууме, остаток промывали ацетоном, эфиром и перекристаллизовывали из метанола. Выход 9,8 г (41%); т. пл. 286—287°. ИК-спектр: 1690, 1775, 3270 см⁻¹. УФ-спектр, λ_{макс}: 240, 275 нм (хлористый метилен). Найдено, %: C 62,68; H 4,92; N 7,19. Вычислено, %: C 62,8; H 4,7; N 7,3.

Метод Б. Тщательно растертую смесь 11,8 г *n*-аминофенола и 10,8 г янтарного ангидрида смешивали с 10 мл ДМФА и нагревали в течение 3 ч при 140°. Темно-вишневый полукристаллический продукт промывали холодным метанолом и серным эфиром. Выход 14 г (68%); т. пл. 287—287,5°. ИК-спектр идентичен вышеуказанному в методе А.

n-Сукцинимидо-*o*-нитрофенол (VI). Суспензию 7,42 г соединения (V) в 30 мл воды и 23,2 мл HNO₃ (*d* 1,3) перемешивали 18 ч при комнатной температуре. Желтый кристаллический осадок отфильтровывали, промывали водой, метанолом и серным эфиром. Остаток перекристаллизовывали из смеси ДМФА — петролейный эфир. Выход 7,18 г (78,3%); т. пл. 241—241,5°. ИК-спектр: 1550, 1710, 1780 сл. УФ-спектр: λ_{макс} 275, 355 нм (ДМФА, тетрагидрофуран).

Найдено, %: C 51,02; H 3,14; N 11,93. Вычислено, %: C 51,13; H 2,56; N 11,95.

n-Сукцинимидо-*o*-нитрофениловый эфир бензилоксикарбонил-*L*-пролина (VII). К раствору 2,72 г (11,5 ммоль) соединения (VI) и 2,8 г (11,5 ммоль) Cbz-*L*-Про в 30 мл ДМФА, охлажденному до 0°, добавляли 2,85 г (13,7 ммоль) ДЦГК в 10 мл ДМФА и перемешивали 12 ч при 0°. Выпавшую дидиклогексилмочевину отфильтровывали, промывали этилацетатом и эфиром. После упаривания филтраты маслообразный остаток закристаллизовывали смесью эфир — гексан. Кристаллы отфильтровывали, промывали эфиром и гексаном. Выход 2,95 г (55%); т. пл. 103—106°. ИК-спектр: 1710, 1785 см⁻¹ (силы). Найдено, %: C 58,87; H 4,32; N 9,03. Вычислено, %: C 59,08; H 4,52; N 8,98.

n-Сукцинимидо-*o*-нитрофениловый эфир бензилоксикарбонилглицина (VIII). Данное соединение получали в условиях, аналогичных предыдущему эксперименту. Выход 63% (перекристаллизация из смеси хлористый метилен — гексан), т. пл. 186—187°. Найдено, %: C 56,00; H 3,70; N 9,75. Вычислено, %: C 56,50; H 3,53; N 9,89.

Аминолиз соединения (VIII) этиловым эфиром глицина. 0,82 г хлоргидрата этилового эфира глицина суспендировали в 8 мл ДМФА, содержащего 0,9 мл триэтиламина, и через 1 мин добавляли 2,5 г активированного эфира (VIII). Реакционную смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре, разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой, 1 н. NaHCO₃, водой, сушили над Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовали из смеси этилацетат — гексан. Выход 1,5 г (87%); т. пл. 80—81° (ср. 80—81° [9]).

Полимерные сукцинимидонитрофениловые эфиры *N*-защищенных аминокислот (типичная методика). К суспензии 1 экв. полимера (III), содержащего 2,75 ммоль фенольных групп на 1 г полимера, в растворе Cbz-L-Cys(Bzl) (2 экв.) в ДМФА, охлажденном до 0°, добавляли ДЦГК (3 экв.) и реакционную массу перемешивали 12 ч при 0°. Затем полимер отфильтровывали, промывали метанолом, эфиром и сушили в вакууме. Выход полимерного эфира 93%, содержание аминокислоты 1,4 ммоль/г полимера. ИК-спектр: 1710, 1785 см⁻¹ (сильн.).

Остальные полимерные эфиры были получены по аналогичной методике (см. табл. 1).

Синтез пептидов. Этиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*S*-бензил-*L*-цистеинил-глицина (типичная методика). К суспензии 2,58 г (3,6 ммоль) полимерного эфира Cbz-L-Cys(Bzl) и 0,50 г (3,6 ммоль) хлоргидрата GlyOEt в 15 мл ДМФА добавляли 0,52 мл (3,6 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при комнатной температуре, затем отфильтровывали, промывали метанолом и фильтрат упаривали досуха. Остаток растворяли в этилацетате, промывали водой, сушили и упаривали в вакууме. В остатке получали 1,4 г (91%) кристаллического продукта с т. пл. 95—97°. После перекристаллизации его из смеси этилацетат — гексан получали 1,31 г (85%) защищенного дипептида с т. пл. 97—98°, $[\alpha]_D^{22}$ —26,7° (с 6; AcHO) (ср. т. пл. 98—99°, $[\alpha]_D^{22}$ —26,8° (с 6; AcHO) [10]).

Выходы и константы полученных пептидов приведены в табл. 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Patchornik A., Fridkin M., Katchalski E. (1972) The Chemistry of Polypeptides. Essays in Honor of Prof. Zervas Ch. (Katsoyannis P. G., ed.), pp. 315—333, Plenum Press, N. Y.
2. Patchornik A., Kraus M. A. (1975) Pure and Appl. Chem., 43, 503—526.
3. Fridkin M., Patchornik A., Katchalski E. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 3164—3165.
4. Скляров Л. Ю., Горбунов В. И., Щукина Л. А. (1966) Ж. общ. химии, 36, 2220—2221.
5. Panse G. T., Laufer D. A. (1970) Tetrahedron Lett., № 48, 4181—4184.
6. Kalir R., Fridkin M., Patchornik A. (1974) Eur. J. Biochem., 42, 151—156.
7. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Юрганов А. И. (1973) Докл. АН СССР, 211, 1356—1358.
8. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Юрганов А. И. (1973) Докл. АН СССР, 212, 108—111.
9. Anderson G. W., Young R. W. (1952) J. Amer. Chem. Soc., 74, 5307—5309.
10. Goldschmidt S., Jutz C. (1953) Chem. Ber., 86, 1116—1121.

Поступила в редакцию
18.VII.1977

MACRONET HIGH MOLECULAR WEIGHT SUCCINIMIDONITROPHENOL IN PEPTIDE SYNTHESIS

ROGOZHIN S. V., DAVIDOVICH Yu. A., ANDREEV S. M.,
MRACHKOVSKAYA T. A.

*Institute of Organo-Element Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Insoluble poly-*p*-succinimido-*o*-nitrophenol has been applied in peptide synthesis for activation of amino acid carboxyl groups. This polymer was synthesized by treatment of macronet styrene-maleic anhydride copolymer with *p*-aminophenol followed by nitration. The active esters of a number of *N*-protected amino acids were prepared by dicyclohexylcarbodiimide method. Starting from above polymer active esters, di- and tripeptides were obtained in good yield. Monomeric *p*-succinimido-*o*-nitrophenol was also found to be useful in conventional peptide synthesis.