



УДК 547.466:543.544

**ГИДРОФИЛЬНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ РЕАГЕНТЫ  
ДЛЯ ПЕПТИДНОГО СИНТЕЗА***Самойлова Н. А., Андреев С. М., Галкин О. М.,  
Давидович Ю. А., Рогожин С. В.**Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова  
Академии наук СССР, Москва*

Синтезированы шитые гидрофильные полимеры с N-оксисукцинимидными группировками и на их основе активированные эфиры N-ациламинокислот, позволяющие осуществлять реакции образования пептидной связи как в водных, так и в органических средах. Их эффективность продемонстрирована в синтезе тафдина и фрагмента 26–33 холецистокинин-панкреозимина.

В последние годы значительно возрос интерес к проблеме синтеза пептидов в водных средах в условиях, близких к физиологическим. К этой проблеме относятся вопросы, связанные с использованием ферментов для образования пептидной связи, введения и удаления защитных групп [1], поиск новых гидрофильных защитных групп для повышения растворимости пептидов [2–4], а также химических методов синтеза с применением низкомолекулярных реагентов [5–9] и полимерных носителей [10–13].

Проведение аминолиза активированного карбоксильного компонента в слабоосновной водной среде позволяет отказаться от защиты обладающих низкой нуклеофильностью боковых функций аминокомпонента; блокировка необходима лишь для  $\text{NH}_2$ - и SH-групп. Следствием этого является резкое увеличение гидрофильности защищенного пептида, что приводит к устранению проблемы растворимости и позволяет очищать промежуточные фрагменты и конечные продукты методами ионообменной и гель-хроматографии. Сведение к минимуму числа защитных групп снижает потери на стадии получения исходных соединений, а также уменьшает риск протекания побочных процессов при их удалении.

При проведении конденсации в водной среде реакция аминолиза обычно сопровождается конкурентным гидролизом активированного карбоксильного компонента. Обе реакции pH-зависимы, их кинетика определяется природой активированного карбоксильного компонента, величиной pK аминокомпонента и стерическими факторами. Величина pH может влиять не только на степень ионизации ионогенных групп аминокомпонента, но и в некоторых случаях на его конформационное состояние. Для ряда активированных производных влияние этих факторов на ход аминолиза было исследовано [6, 12, 14–18]. Так, для большинства типов

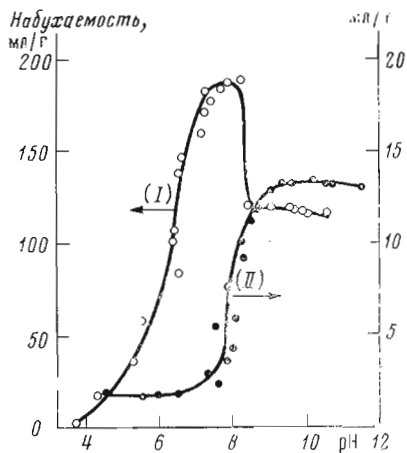
Принятые сокращения: -ONSup-I и ONSup-II – полимерные N-оксисукцинимид (I) и (II), Nps – нитрофенилсульфенильная группа.

активированных производных, за небольшим исключением [17], установлено, что в щелочных средах скорость аминолиза заметно превышает скорость гидролиза.

Однако в литературе практически отсутствуют данные, характеризующие реакционную способность в водных средах таких широко применяемых активированных эфиров, как N-оксисукцинимидные. Тем не менее эти соединения, как низкомолекулярные, так и полимерные, оказались весьма эффективными при синтезе пептидов в водных средах [7, 13].

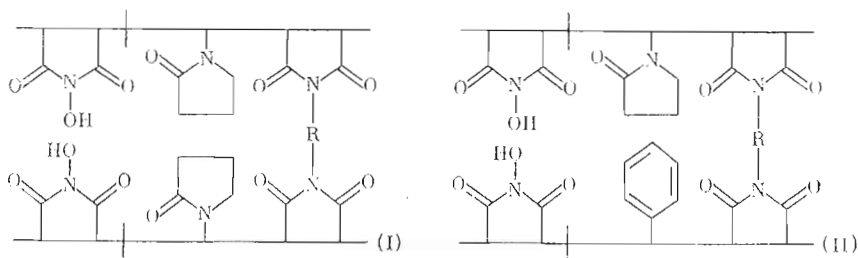
Применение полимерных реагентов для синтеза пептидов (полимер выполняет роль активатора карбоксильной группы аминокислоты или пептида [19]) сулит очевидные преимущества перед методами синтеза в растворе (быстрый путь получения вследствие более простой очистки как активированного производного, так и продукта реакции) и перед твердофазным методом пептидного синтеза (возможность использования более широкого диапазона защитных групп и очистки на каждой стадии синтеза). Описано несколько нерастворимых гидрофильных полимерных реагентов [11–13].

Так, для ацетилирования аминов в водных средах применяли полимерный смешанный ангидрид на основе полистирольного сульфокислотного ионообменника [11] и полимерный тиоэфир на основе сополимера серосодержащего амида акриловой кислоты с акриламидом [12]. Целый ряд дипептидов для энантиомерного анализа аминокислот



Набухаемость полимерных N-оксисукцинимидов (I) и (II) в воде

получали из свободных аминокислот с помощью полимерных N-оксисукцинимидных реагентов в водной среде [13]. В качестве полимера-активатора при этом использовали сферически гранулированный, сшитый диаминодифенилоксидом, чередующийся сополимер N-оксималеимида и N-винилпирролидона (I).



R: c1ccc(Oc2ccc(O)cc2)cc1; для (I) — 6 мол.%, (II) — 10 мол.%.

В настоящей работе описано получение полимера (II), а также использование поли-N-оксисукцинимидов (I) и (II) в синтезе пептидов, как в водных, так и в органических средах.

Полимер (II) выгодно отличается от полимера (I) на порядок более высокой набухаемостью (рисунок) в водных щелочных средах. Указанный эффект достигался в основном за счет того, что сшиванию в растворе подвергали не сополимер малеинового ангидрида с N-винилпирролидоном, как при получении полимера (I) [13], а одновременно два сополимера, взятых в эквимольных количествах, — сополимер малеинового

**Активация N-защищенных аминокислот и пептидов (R-COOH) с помощью полимерных N-оксисукцинимидов (I) и (II) методом смешанных ангидридов (МСА), дициклогексилкарбодиимидным (ДЦГК) и трифторацетатным (ТФА) способами**

Тип полимера	R-COOH	Метод активации	Исходное мольное соотношение R-COOH/полимер	Выход, %	Содержание R-COOH в полимере, ммоль/г
(I)	Z-Gly	МСА	1,35	64,0	1,47
(I)	»	ДЦГК	2,60	40,0	0,96
(I)	Boc-Gly	МСА	1,60	77,9	1,70
(II)	»	»	0,77	79,0	1,40
(I)	Nps-Gly	»	1,25	23,0	0,62
(I)	Boc-Ala	»	1,63	82,2	1,81
(II)	»	»	0,80	77,2	1,52
(I)	Boc-β-Ala	ДЦГК	2,50	79,4	1,77
(II)	»	»	0,67	83,6	0,93
(I)	»	МСА	1,90	81,7	1,80
(I)	»	ТФА	1,25	39,1	1,03
(I)	Boc-Leu	МСА	1,10	84,4	1,71
(I)	»	ДЦГК	1,74	71,5	1,56
(I)	Boc-Phe	МСА	2,50	56,9	1,25
(I)	Boc-Met	»	0,77	58,3	0,74
(II)	»	»	1,00	67,2	1,33
(I)	Boc-Pro	»	1,90	68,1	1,52
(II)	»	»	1,00	55,5	1,20
(II)	»	ДЦГК	0,80	29,5	0,66
(II)	»	»	1,15	37,0	0,91
(II)	Boc-Thr	МСА	0,80	76,7	1,34
(I)	Boc-Tyr	»	0,94	55,5	1,24
(II)	»	»	0,86	99,5	1,93
(I)	Boc-Asy (OBu <sup>t</sup> )	»	0,69	74,7	1,09
(II)	»	»	0,72	68,0	1,12
(II)	Boc-Lys (Z)	»	1,00	73,7	1,03
(II)	Boc-Asp (OBu <sup>t</sup> )-Tyr-Met-Gly	»	0,16	70,0	0,30

ангидрида с N-винилпирролидоном и сополимер малеинового ангидрида со стиролом. Далее спитый полимер, имеющий форму сферических гранул, обрабатывали гидроксиламиноом. Такой полимер-активатор (II) обладал практически тем же удельным содержанием N-оксигрупп (3—4 ммоль/г полимера), что и полимер (I), но значительно превосходил его по эксплуатационным характеристикам: гранулы полимера были более прочными и практически не повреждались при различных манипуляциях, сопутствующих пептидному синтезу.— перемешивании, фильтровании и т. п.

Полимерные активированные эфиры N-защищенных аминокислот и пептидов на основе полимеров (I) и (II) получали согласно работе [20] методом смешанных ангидридов, дициклогексилкарбодиимидным и трифторацетатным способами (таблица). В последнем случае выход не всегда был высоким, по-видимому, вследствие протекания побочных процессов [21].

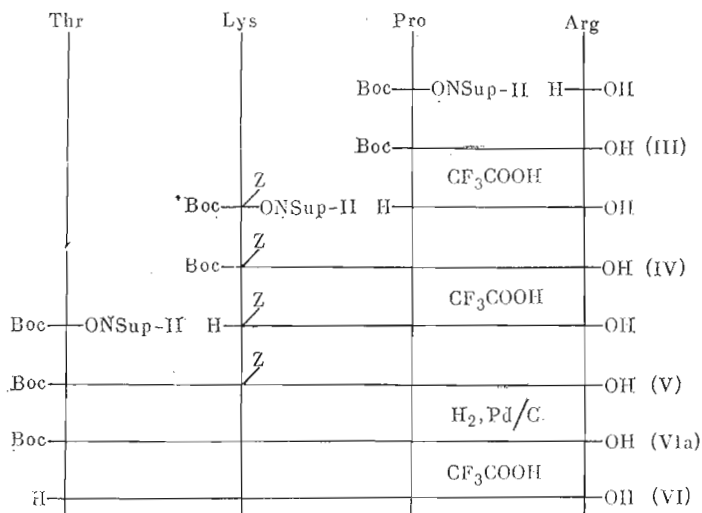
В настоящей работе ряд полученных полимерных эфиров N-ациламиннокислот использовали для синтеза более сложных, чем в предыдущей работе [13], пептидов: тафцина [22] и защищенного фрагмента 26—33 холецистокинин-панкреозимина [23]. Эти объекты удобны для проведения синтеза в водных средах, так как содержат гидрофильные и трифункциональные аминокислоты (последние использовались без защиты боковых функций, за исключением ε-аминогруппы лизина).

Реакцию амиолиза обычно проводили при избытке полимерного реагента в воде при pH 8—9 (поддерживали добавлением щелочи или третичного органического амина). Протекание реакции контролировали тонкослойной хроматографией. Вышеупомянутый фрагмент холецистокинин-панкреозимина

мина получали, не только в водной, но и в органической (ДМФА) среде. Растворимость низкомолекулярного продукта гидролиза полимерного эфира (в случае синтеза в воде) и полученного пептида была различной, поэтому продукт реакции (после отделения дезацилированного полимерного реагента) очищали простыми методами — отмывкой и переосаждением, не прибегая к хроматографическим процедурам.

Синтез таффина Thr-Lys-Pro-Arg проводили в водной среде с помощью полимерных эфиров, полученных на основе полимера (II), постепенным наращиванием пептидной цепи, исходя из свободного аргинина (схема 1).

Схема 1

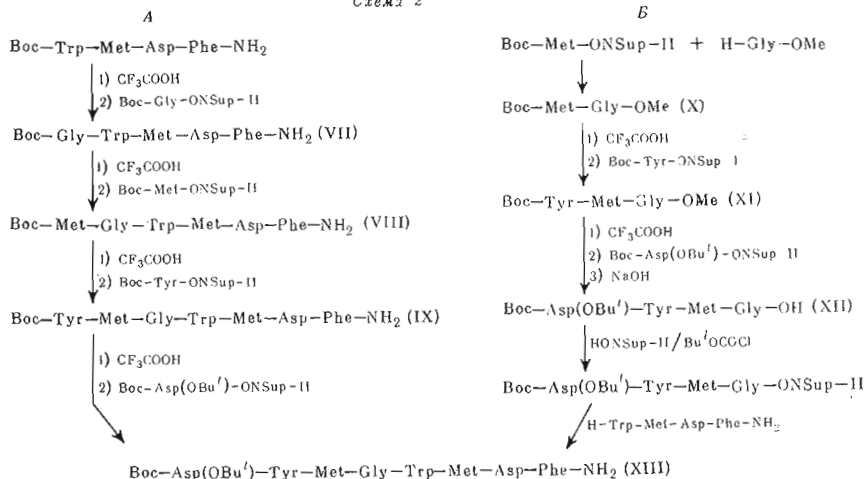


Ранее таффин получали по той же схеме (из свободного аргинина) методом низкомолекулярных *N*-оксисукцинимидных [7, 26] и *n*-нитрофениловых эфиров [24, 25], а также с помощью *N*-карбоксиянгидридов [26]. В работе [27] аргинин вводили на последней стадии синтеза конденсацией его с низкомолекулярным *N*-оксисукцинимидным эфиром трипептида в водном диоксане. Выход при этом колебался от 28 [26] до 43% [24].

В предложенном нами варианте синтеза (схема 1) общий выход таффина составлял 42%. Сравнительно низкий выход (61%) отмечали на стадии получения трипептида (IV). Это связано, по-видимому, с пониженной реакционной способностью аминоконцентра пролиларгинина и довольно высокой гидрофобностью полимер-активированного защищенного лизина. Таффин имел характеристики, соответствующие литературным данным, и обладал биологической активностью [28].

Фрагмент холецистокинин-панкреозимина (XIII) синтезировали, исходя из полученного ранее [29] Boc-Tyr-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>, постепенным наращиванием пептидной цепи (вариант А, схема 2) либо конденсацией двух тетрапептидов (вариант В, схема 2). Этот синтез проводился с целью исследования эффективности метода гидрофильных поли-*N*-оксисукцинимидных реагентов при получении более высокомолекулярных, чем таффин, пептидов.

Получение октапептида (XIII) по варианту А (схема 2) осуществляли в водной среде; пентапептид (VII), кроме того, был синтезирован в ДМФА. Выходы на стадиях конденсации составляли 74,5–86%; более низкий выход отмечали при получении гептапептида (IX) (56,3%). Синтез по варианту В (схема 2) проводили в ДМФА; осложнений не наблюдалось, лишь на последней стадии выход был невысоким (47%). Оба варианта синтеза



(схема 2) привели к получению пептидов, идентичных по физико-химическим параметрам.

В литературе описано получение октапептида (XIII) аналогичным способом — конденсацией двух тетрапептидов через соответствующий *n*-нитрофениловый эфир [30] (выход продукта был несколько ниже, чем по нашей методике), а также карбодимидным способом в присутствии 1-оксибензотриазола [31] (выход 63%), но в этом случае боковая карбоксильная группа Asp<sup>32</sup> была защищена.

Использованный в настоящей работе метод гидрофильных полимерных реагентов позволяет осуществлять гибкий подход к синтезу: в зависимости от свойств синтезируемых пептидов проводить аминолиз либо в водной среде, либо в полярном органическом растворителе. При этом необходимо учитывать, что на ход реакции могут также влиять свойства полимерного активированного эфира, как, например, при синтезе пептида (IV). Кроме того, в отличие от синтеза в безводных системах использование водных сред в ряде случаев может осложнять выделение продукта реакции за счет присутствия гидролизованного карбоксильного компонента. При увеличении молекулярной массы аминокомпонента, в частности при модификации белков, разделение в общем случае облегчается и может быть сведено к гель-хроматографии.

Методика работы с полимерными реагентами отличается простотой. После проведения аминолиза полимер-активатор может быть регенерирован путем обработки сильным нуклеофильным агентом, например циклогексиламином или гидроксиламином, с последующей отмывкой водой и органическими растворителями практически без потери реакционной емкости по N-оксигруппам.

### Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на приборе Кофлера. ИК-спектры снимали на приборе UR-20 (KBr). Оптическое вращение измеряли на поляриметре «Perkin-Elmer 141» (США). Аминокислотный анализ выполняли на приборе «Hitachi KLA-3B» (США), рН определяли с помощью рН-метра рН-262. Для ТСХ на пластинках «Silufil» (S) (ЧССР) и фирмы «Merck» (ФРГ) (M) использовали системы: изопропанол — пиридин — CH<sub>3</sub>COOH — H<sub>2</sub>O, 10 : 5 : 4 : 4 (1); изопропанол — пиридин — H<sub>2</sub>O, 4 : 1 : 1 (2); *n*-бутанол — изопропанол — H<sub>2</sub>O — хлоруксусная кислота, 65 : 15 : 20 : 3 (3); *n*-бутанол — CH<sub>3</sub>COOH — H<sub>2</sub>O, 4 : 1 : 1 (4); *n*-бутанол — CH<sub>3</sub>COOH — пиридин — H<sub>2</sub>O, 30 : 6 : 20 : 24 (5); этилацетат — пиридин — CH<sub>3</sub>COOH —

H<sub>2</sub>O, 60 : 20 : 6 : 11 (6); проявление парами I<sub>2</sub>, нитридом, реактивом Эрлиха\*.

В работе использованы производные аминокислот фирмы «Reanal» (Венгрия). Пептид *Woc-Trp-Met-Asp-PheNH<sub>2</sub>* получен ранее [29]. Сополимер малеинового ангидрида с N-винилпирролидоном получали согласно работе [32], M30 000 (метод ультрацентрифугирования); по данным элементного анализа и потенциометрического титрования, сополимер чередующийся. Сополимер малеинового ангидрида со стиролом — производства Стерлитамакского химического комбината.

Поли-N-оксисукцинимид (I) получали согласно методике [13]; содержание N-оксигрупп 3,5 ммоль/г (по данным элементного анализа) и 3,2 ммоль/г (по методике [33]). Набухаемость (объем набухшего полимера в мл на 1 г исходного): ДМФА — 11,7, пиридин — 6,7, метанол — 2,7, тетрагидрофуран — 2,3, метилхлорид — 1,8, вода — см. рисунок. Набухаемость в воде определяли следующим образом: образец полимера (0,2—0,6 г) заливали избыточным количеством воды и выдерживали 18—20 ч, далее прибавляли 1—2 капли 4 н. NaOH, выдерживая при этом такое же время и измеряя pH суспензии после выдержки; получаемые при различных pH объемы полимера пересчитывали на 1 г исходного сухого полимера.

Поли-N-оксисукцинимид (II). К раствору сополимеров малеинового ангидрида с N-винилпирролидоном (60 г, 287,08 ммоль) и малеинового ангидрида со стиролом (58 г, 287,08 ммоль) в 300 мл ДМФА прибавляли раствор 11,48 г (28,7 ммоль) диаминодифенилоксида в 45 мл ДМФА; полученный раствор приливали при перемешивании к 1500 мл полиэтилсилоксановой жидкости (ПЭС-5). Образовавшуюся эмульсию перемешивали 3 ч при 20° С и оставляли на 16 ч. Затем полимер отфильтровывали, промывали эфиром, смесью уксусного ангидрида с ДМФА (2 : 1 по объему), ацетоном, эфиром. Суспензию полученного полимера в 1000 мл раствора хлоридрата гидроксидамида (100 г) в пиридине нагревали при перемешивании в течение 5 ч при 60° С. Полимер отфильтровывали, промывали водой, 0,5 н. HCl, водой, ацетоном, эфиром, сушили в вакууме. Выход поли-N-оксисукцинимид (II): 130 г (сферические гранулы 0,1—0,3 мм). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 1650, 1710, 1780, 3200—3500. Содержание N-оксигрупп 3,33 ммоль/г (по методике [33]). Набухаемость: ДМФА — 7,3; вода — см. рисунок.

Полимерные активированные эфиры на основе сополимеров (I) и (II) получали согласно работе [20] (см. таблицу).

### Синтез тафцина

*Woc-Pro-Arg-OH (III)*. К раствору 2,26 г (13,0 ммоль) аргинина в 40 мл воды прибавляли 12,1 г (13,8 ммоль) *Woc-Pro-ONSup-II* и реакционную смесь перемешивали 48 ч при pH 9,0 (pH поддерживали добавлением N-метилморфолина) и 20° С, в процессе реакции добавляли еще 60 мл воды. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали водой, метанолом. Фильтрат упаривали в вакууме, остаток промывали этилацетатом, эфиром. Кристаллизовали из системы метанол — эфир. Выход дипептида (III) 4,10 г (82%); т. пл. 178—183° С;  $R_f$  0,78 ( $S_1$ ), 0,57 ( $S_2$ ), 0,43 ( $M_3$ ).  $[\alpha]_D^{20}$  —48,8° (с 1, метанол). Найдено, %: С 49,44; Н 7,97; N 18,00. C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> · H<sub>2</sub>O. Вычислено, %: С 49,36; Н 7,97; N 17,99.

*Woc-Lys(Z)-Pro-Arg-OH (IV)*. 1,40 г (3,64 ммоль) дипептида (III) выдерживали 25 мин в 5 мл CF<sub>3</sub>COOH при 20° С и упаривали. Остаток промывали эфиром, затем растворяли в 20 мл воды. К полученному раствору прибавляли 5,80 г (5,7 ммоль) *Woc-Lys(Z)-ONSup-II* и реакционную смесь перемешивали 30 ч при pH 8,4 (поддерживали добавлением 4 н. NaOH) и

\* Далее тип пластинок обозначен буквой, а номер системы — подстрочным индексом.

20° С. В процессе набухания полимера прибавляли еще 40 мл воды. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали водой и метанолом. Объединенный фильтрат упаривали в вакууме, остаток промывали эфиром и суспендировали в воде. Кислотность суспензии доводили до pH 3 (конц. HCl) и сразу экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный слой промывали водой, высушивали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Водные слои объединяли, добавляли NaCl до насыщения, выпавший осадок высушивали и затирали с эфиром. Продукты, полученные из этилацетатного и водного слоев, объединяли, растворяли в метаноле и высаживали эфиром. Выход трипептида (IV) 1,48 г (61%); температура размягчения 108–110° С.  $R_f$  0,90 ( $M_1$ ), 0,58 ( $M_2$ ), 0,49 ( $M_3$ ).  $[\alpha]_D^{20} -40,0^\circ$  (с 1, метанол). Найдено, %: С 55,20; Н 7,60; N 15,10.  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 55,28; Н 7,58; N 15,04. Аминокислотный анализ: Lys 0,96; Pro 1,00; Arg 0,94.

*Вос-Thr-Lys(Z)-Pro-Arg-OH (V)*. 0,58 г (0,89 ммоль) трипептида (IV) растворяли в 5 мл  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , через 30 мин раствор упаривали, остаток промывали эфиром и растворяли в 10 мл воды. К раствору прибавляли 2,0 г (2,5 ммоль) *Вос-Thr-ONSup-II* и перемешивали реакционную смесь 24 ч при pH 8,0 (поддерживали добавлением 4 н. NaOH) и 20° С. В процессе реакции добавляли еще 10 мл воды. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали метанолом. Объединенные фильтраты упаривали, остаток пересаждали из метанола в эфир. Выход тетрапептида (V) 0,56 г (84,3%);  $R_f$  0,85 ( $M_1$ ), 0,38 ( $M_3$ ),  $[\alpha]_D^{20} -39,8^\circ$  (с 1, метанол). Найдено, %: С 54,10; Н 7,47; N 14,56.  $\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_{10} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 54,24; Н 7,50; N 14,89. Аминокислотный анализ: Thr 1,01; Lys 0,98; Pro 1,00; Arg 0,98.

*H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH (VI)*. 0,372 г (0,50 ммоль) тетрапептида (V) растворяли в смеси 10 мл метанола и 1 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , добавляли 0,2 г 5% Pd/C и перемешивали в атмосфере водорода 6 ч при 20° С. Затем катализатор отфильтровывали и фильтрат упаривали. Остаток суспендировали в смеси эфир—этилацетат (по 2 мл), отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали. Выход *Вос-Thr-Lys-Pro-Arg-OH (VIa)* 0,29 г (94%).  $R_f$  0,80 ( $M_1$ ).

0,236 г (0,38 ммоль) соединения (VIa) растворяли в 2 мл  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , через 1 ч продукт осаждали эфиром, промывали эфиром на фильтре и высушивали. Выход тетрапептида (VI) 0,317 г (98% в расчете на (VIa)).  $[\alpha]_D^{20} -59,0^\circ$  (с 0,5; 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ );  $R_f$  0,30 ( $M_1$ ), 0,06 ( $M_2$ ). Найдено, %: С 38,41; Н 5,38; N 13,3.  $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_6 \cdot 3\text{CF}_3\text{COOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 38,39; Н 5,37; N 13,27. Лит. данные:  $[\alpha]_D^{20} -58,3^\circ$  (с 0,6; 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) [24],  $-60,7^\circ$  (с 0,98; 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) [34]. Для проведения биологических испытаний тафцин (VI) переводили в ацетат.

#### Синтез фрагмента 26—33 холецистокинин-панкреозимина

*Вос-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (VII)*. Синтез в воде. К 0,40 г (0,57 ммоль) *Вос-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>* прибавляли 6,5 мл  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , выдерживали раствор 1 ч в токе аргона, продукт высаживали эфиром, затем фильтровали и промывали эфиром. После высушивания полученный трифторацетат растворяли в 15 мл воды, добавляли 1,2 г триэтиламина и 3 г (4,2 ммоль) *Вос-Gly-ONSup-II*. Реакционную смесь перемешивали 45 ч при pH 9,0 (поддерживали добавлением триэтиламина) и 20° С. Через 20 ч после начала реакции прибавляли еще 1 г *Вос-Gly-ONSup-II* и 10 мл воды. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали водой; фильтрат подкисляли конц. HCl до pH 3 и добавляли NaCl до насыщения. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, эфиром, высушивали. Часть продукта дополнительно выделяли из фильтрата после промывки полимера ДМФА. Общий выход (VII) 86%; т. пл. 192–195° С (с разл.);  $R_f$  0,67 ( $S_1$ ).  $[\alpha]_D^{20} -24,2^\circ$  (с 2, ДМФА). Найдено, %: С 56,38; Н 6,22; N 12,84; S 4,19.  $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_9\text{S}_1$ . Вычислено, %: С 57,36; Н 6,29;

N 13,00; S 4,25. Литературные данные: т. пл. 196—198° С (с разл.) [35]; 185—186° С (с разл.) [36].

*Синтез в ДМФА.* Вос-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> деблокировали в условиях предыдущей реакции; 0,40 г (0,56 ммоль) полученного трифторацетата растворяли в 8 мл ДМФА, добавляли 0,08 мл триэтиламина и 2,1 г (2,8 ммоль) Вос-Gly-ONSup-II. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 20°. В процессе реакции добавляли еще 12 мл ДМФА. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали ДМФА, ацетоном. Фильтрат упаривали, остаток суспендировали в смеси этилацетат—эфир, отфильтровывали, высушивали. Выход пентапептида (VII) 0,40 г (95%); т. пл. 190—192° С (с разл.);  $R_f$  0,67 ( $S_4$ );  $[\alpha]_D^{21}$  -24,0° (с 2, ДМФА).

*Вос-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (VIII).* К 0,35 г (0,46 ммоль) пентапептида (VII) добавляли 5 мл CF<sub>3</sub>COOH и 0,25 мл анизол, реакционную смесь выдерживали 40 мин, затем разбавляли эфиром. Выпавший продукт отфильтровывали, промывали эфиром, высушивали. Полученный продукт растворяли в 15 мл воды, добавляли 2,0 г Вос-Met-ONSup-II и перемешивали реакционную смесь 23 ч при pH 8—8,3 (поддерживали добавлением триэтиламина) и 20° С. В процессе реакции добавляли еще 10 мл воды. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали водой. Фильтрат подкисляли конц. HCl до pH 3, осадок отфильтровывали, промывали водой и эфиром, затем высушивали. Выход гексапептида (VIII) 0,306 г (74,5%); т. пл. 181—183° С (с разл.);  $R_f$  0,65 ( $S_4$ );  $[\alpha]_D^{22}$  -19,6° (с 1, ДМФА). Найдено, %: С 55,11; Н 6,52; N 12,33; S 7,02. C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: С 55,64; Н 6,38; N 12,65; S 7,25. Литературные данные: т. пл. 184—185° С,  $[\alpha]_D^{23}$  -19,7° (с 1,4, ДМФА) [30]; т. пл. 200—201° С,  $[\alpha]_D^{25}$  -30,3° (с 2, ДМФА) [35].

*Вос-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (IX).* Вос-группу гексапептида (VIII) удаляли обработкой CF<sub>3</sub>COOH в условиях предыдущего эксперимента. 0,255 г (0,28 ммоль) полученного продукта растворяли в 8,5 мл воды и добавляли 2,0 г (3,86 ммоль) Вос-Tyr-ONSup-II. Реакционную смесь перемешивали 27 ч при pH 8 (поддерживали добавлением триэтиламина) и 20° С. В процессе реакции добавляли еще 15 мл воды. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали водой, ДМФА, ацетоном. Фильтрат концентрировали в вакууме до небольшого объема и подкисляли конц. HCl до pH 3. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, эфиром, высушивали. Выход гептапептида (IX) 0,161 г (53,6%); т. пл. 186—187° С;  $R_f$  0,79 ( $S_4$ );  $[\alpha]_D^{23}$  -25,5° (с 1, ДМФА). Найдено, %: С 56,98; Н 6,41; N 11,84; S 6,00. C<sub>50</sub>H<sub>65</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: С 57,29; Н 6,25; N 12,02; S 6,12. Литературные данные: т. пл. 178—179° С,  $[\alpha]_D^{25}$  -26° (с 2, ДМФА); т. пл. 181—181,5° С,  $[\alpha]_D^{25}$  -26,6° (с 2, ДМФА) [35].

*Вос-Met-Gly-OMe (X).* 1,80 г (14,3 ммоль) хлоргидрата метилового эфира глицина растворяли в 60 мл ДМФА, добавляли 1,45 г (14,3 ммоль) триэтиламина и 10,75 г (14,30 ммоль) Вос-Met-ONSup-II, затем перемешивали 24 ч при 20° С. Полимер отфильтровывали, промывали метанолом и эфиром. Фильтрат упаривали. Остаток растворяли в смеси этилацетат—вода. Этилацетатный слой промывали 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, 5% раствором лимонной кислоты, снова водой, высушивали Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Кристаллизовали из системы эфир—гексан. Выход соединения (X) 3,43 г (75%). Т. пл. 86—88° С,  $R_f$  0,66 ( $S_4$ ).  $[\alpha]_D^{20}$  -13,4° (с 1, ДМФА). Найдено, %: С 48,79; Н 7,57; N 8,61; S 10,02. C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>1</sub>. Вычислено, %: С 48,74; Н 7,55; N 8,75; S 9,99.

*Вос-Tyr-Met-Gly-OMe (XI).* К 0,67 г (2,08 ммоль) соединения (X) прибавляли 2 мл CF<sub>3</sub>COOH и выдерживали 20 мин. Вещество высаждали эфиром, промывали декантацией эфиром и высушивали. Остаток растворяли в 5 мл ДМФА, добавляли 0,38 г (3,28 ммоль) N-этилморфолина и



3,50 г (4,34 ммоль) Вос-Тур-ONSup-I. Реакционную смесь перемешивали 24 ч при 20° С. В процессе реакции добавляли еще 33 мл ДМФА. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали ДМФА, метанолом, эфиром, фильтр упаривали. Остаток растворяли в смеси этилацетат — вода, этилацетатный слой промывали 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, 5% лимонной кислотой, водой, высушивали Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток суспендировали в гексане, отфильтровывали, высушивали. Выход трипептида (XI) 0,77 г (76,6%); температура размягчения 70° С;  $R_f$  0,85 ( $S_4$ );  $[\alpha]_D^{20}$  —11,7° ( $c$  1, ДМФА). Найдено, %: С 54,31; Н 6,91; N 8,68; S 6,57. C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>1</sub>. Вычислено, %: С 54,60; Н 6,84; N 8,70; S 6,62.

Вос-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-Gly-OH (XII). 2,52 г (5,20 ммоль) трипептида (XI) обрабатывали CF<sub>3</sub>COOH в условиях предыдущего эксперимента. Полученный продукт растворяли в 30 мл ДМФА, добавляли 1,55 г (13,1 ммоль) N-этилморфолина и 9,47 г (40,6 ммоль) Вос-Asp(OBu<sup>t</sup>)-ONSup-II; реакционную смесь перемешивали 48 ч при 20° С. В процессе реакции добавляли еще 30 мл ДМФА. Далее обработку проводили как в предыдущем опыте. Остаток после упаривания этилацетатного раствора переосаждали из системы этилацетат — петролейный эфир. Выход метилового эфира (XIIa) 2,44 г (73%); температура размягчения 95—97° С;  $R_f$  0,80 ( $S_4$ ).

0,62 г (0,96 ммоль) соединения (XIIa) растворяли в 2 мл метанола, добавляли 2 мл 0,5 н. NaOH; через 3 ч раствор подкисляли до pH 3 конц. HCl и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный слой промывали 5% лимонной кислотой, водой, сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток суспендировали в гексане, отфильтровывали и высушивали. Выход тетрапептида (XII) 0,506 г (97,5% в расчете на (XIIa)); температура размягчения 103—105° С;  $R_f$  0,57 ( $S_4$ );  $[\alpha]_D^{20}$  —17,8° ( $c$  0,53; ДМФА); ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 1750 отсутствует (сл. эфир). Найдено, %: С 54,11; Н 6,99; N 8,80; S 5,18. C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S<sub>1</sub>. Вычислено, %: С 54,36; Н 6,92; N 8,74; S 5,00. Аминокислотный анализ: Asp 0,90; Tyr 1,11; Met 0,90; Gly 1,00. Лит. данные: т. пл. 100—102° С [31].

Вос-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (XIII). *Вариант А, схема 2.* Вос-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> обрабатывали CF<sub>3</sub>COOH в условиях получения пентапептида (VII) в воде; 0,44 г (0,63 ммоль) полученного вещества растворяли в 8 мл ДМФА, добавляли 0,072 г (0,63 ммоль) триэтиламина и 3,45 г (1,02 ммоль) полимерного (II)-эфира пептида (XI). Реакционную смесь перемешивали 48 ч при 20° С. В процессе реакции добавляли еще 12 мл ДМФА. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали ДМФА, ацетоном. Фильтрат концентрировали в вакууме и разбавляли водой. Полученную суспензию подкисляли до pH 3 конц. HCl, осадок отфильтровывали, промывали водой, ацетоном, этилацетатом, эфиром, высушивали. Выход пептида (XIII) 0,358 г (47%), т. пл. 210—212° С;  $R_f$  0,82 ( $S_4$ ), 0,93 ( $S_6$ );  $[\alpha]_D^{21}$  —25,3° ( $c$  1, ДМФА). Найдено, %: С 56,82; Н 6,24; N 11,21; S 5,13. C<sub>58</sub>H<sub>78</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>S<sub>2</sub>. Вычислено, %: С 57,12; Н 6,45; N 11,49; S 5,26.

*Вариант Б, схема 2.* Гептапептид (IX) деблокировали в условиях получения гексапептида (VIII); 0,0804 г (0,076 ммоль) полученного продукта растворяли в смеси 4 мл воды и 2 мл ДМФА, доводили pH до 8,5 N-этилморфолином и прибавляли 0,5 г (0,56 ммоль) Вос-Asp(OBu<sup>t</sup>)-ONSup-II. Реакционную смесь перемешивали 43 ч при 20° С (pH 8,5 поддерживали добавлением N-этилморфолина), затем полимер отфильтровывали, промывали ДМФА, ацетоном и эфиром. Фильтрат концентрировали в вакууме, затем разбавляли водой и подкисляли до pH 3 0,1 н. HCl. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, эфиром и высушивали. Выход пептида (XIII) 0,0725 г (78,3%); т. пл. 209—211° С;  $R_f$  0,84 ( $S_4$ );  $[\alpha]_D^{22}$  —25,8° ( $c$  1, ДМФА). Аминокислотный анализ: Asp 2,00; Tyr 1,10; Met 2,13; Gly 1,12; Phe 1,05.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Brtník F., Yóst K.* Použití enzymů synthese peptidů.— *Chem. Listy*, 1980, v. 74, № 9, p. 951–964.
2. *Kunz H.* Synthesen mit Z-Phosphonioethoxycarbonyl-Schutzgruppen: Peptidsynthese in Wasser.— *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1978, № 1, p. 67–68.
3. *Tesser G. J., Balvert-Geers J. C.* The methylsulfonylethylloxycarbonyl group, a new and versatile aminoprotective function.— *Int. Pept. and Protein Res.*, 1975, v. 7, № 4, p. 295–305.
4. *Hubbuck A., Danho W., Zahn H.* Cysteic acid, a water soluble protecting group in peptide synthesis.— In: *Peptides, Proc. 5th Amer. Pept. Symp.* / Eds. M. Goodman, J. Meienhofer. N. Y.: Wiley, 1977, p. 540–542.
5. *Pfaender P., Pratzel H., Blecher H., Gorka G., Hansen G.* Peptide synthesis in aqueous phase.— In: *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp.*, 13th./Ed. Y. Wolman, N. Y.: Wiley, 1975, p. 137–140.
6. *Гершкович А. А., Серебряный С. Б.* Водорастворимые 2-нитро-4-сульфофениловые эфиры в синтезе пептидов.— *Биоорганич. химия*, 1979, т. 5, № 8, с. 1125–1132.
7. *Андреев С. М., Галкин О. М., Рогожин С. В.* Синтез тафцина и родственных пептидов.— В сб.: *Тезисы докл. 5-го Всес. симпоз. по химии и физике белков и пептидов*. Баку: 1980, с. 177.
8. *Nozaki S., Kimura A., Muramatsu I.* Rapid peptide synthesis in liquid phase. Preparation of angiotensin II as an example.— *Chem. Lett.*, 1977, № 9, p. 1057–1058.
9. *Hagarty A. F., McCarthy D. G.* Peptide synthesis using unprotected amino acids and novel imidoyl halide reagents.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1980, v. 102, № 13, p. 4537–4538.
10. *Royer G. P., Anantharmaiah G. M.* Peptide synthesis in water and the use of immobilized carboxypeptidase Y for deprotection.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1979, v. 101, № 12, p. 3394–3396.
11. *Laird R. M., Spence M. J.* Solid-phase acylating agents. I. The preparation and reactions of acetylpolystyrenesulphates in aqueous solution.— *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 1977, v. 27, № 4, p. 214–218.
12. *Gosselet M., Sebille B., Buvet K.* Solid-phase acylating polymer carrying thiolester functions—I. Acylation of alifatic amines in aqueous solution.— *Eur. Polym. J.*, 1979, v. 15, № 12, p. 1079–1082.
13. *Самойлова Н. А., Андреев С. М., Цырякин В. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В.* Полимерные реагенты в энантиомерном анализе аминокислот. IV. Синтез диастереомерных дипептидов в водной среде.— *Биоорганич. химия*, 1978, т. 4, № 6, с. 725–728.
14. *Hirschmann R., Strachan R. G., Schwamm H., Schoenewaldt E. F., Joshua H., Barkemeyer B., Veber D. F., Paleveda W. J., Jacobt T. H., Beesley T. E., Denkwalter R. G.* The controlled synthesis of peptides in aqueous medium. III. Use of Leuch's anhydrides in the synthesis of dipeptides. Mechanism and control of side reactions.— *J. Org. Chem.*, 1967, v. 32, № 11, p. 3415–3425.
15. *Khurgin Yu. I., Dmitrieva M. G.* Reactivity of N-acylamino acid *p*-nitrophenyl esters.— *Tetrahedron*, 1965, v. 21, № 9, p. 2305–2312.
16. *Klausner J. S., Meiri T. H., Schneider E.* Peptide synthesis in aqueous solution with *o*-nitro-*p*-sulfonylphenyl esters.— In: *Peptides, Proc. 5th Amer. Pept. Symp.* / Ed. M. Goodman, J. Meienhofer. N. Y.: Wiley, 1977, p. 536–538.
17. *Kemp D. S., Wang S-W., Rebek J., Mollan R. C., Banquer C., Subramanyam G.* Peptide synthesis with benzisoxazolium salts—II. Activation chemistry of 2-ethyl-7-hydroxybenzisoxazolium fluoroborate: coupling chemistry of 3-acyloxy-2-hydroxy-N-ethyl-benzamides.— *Tetrahedron*, 1974, v. 30, № 22, p. 3955–3967.
18. *Addy M. E., Steinman G., Mallette M. F.* A problem in the mechanism of carbodiimide mediated synthesis of peptides in aqueous medium.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1973, v. 52, № 3, p. 1034–1038.
19. *Fridkin M., Patchornic A., Katchalski E.* A synthesis of cyclic peptides utilizing high molecular weight carriers.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1965, v. 87, № 20, p. 4646–4648.
20. *Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Самойлова Н. А., Миронова Н. В., Юрганов А. И., Андреев С. М.* Синтез полимерных N-оксисукцинимидных эфиров N-замещенных аминокислот и пептидов.— *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1975, № 2, с. 428–433.
21. *Андреев С. М., Павлова Л. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В.* Синтез N-трифтор-ацетоксисукцинимидов и его взаимодействие с органическими основаниями.— *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1980, № 5, с. 1078–1081.
22. *Nishioka K., Constantopoulos A., Satoh P. S., Najjar V. A.* The characteristics, isolation and synthesis of the phagocytosis stimulating peptide, tuftsin.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 47, № 1, p. 172–179.
23. *Jorpes J. E., Muir V., Toczko K.* Further purification of cholecystokinin and pancreozymin.— *Acta chem. scand.*, 1964, v. 18, № 10, p. 2408–2410.
24. *Веретенникова Н. И., Агаре З. А., Приеднище Э. И., Чипенс Г. И.* Синтез [Pro<sup>1</sup>]тафцина — нового антагониста фагоцитозстимулирующего пептида.— *Биоорганич. химия*, 1980, т. 6, № 11, с. 1615–1619.
25. *Лаврецкая Э. Ф., Ашмарин И. П., Калихевич В. Н., Чаморовская Л. Т., Бала-*

- бан П. М., Леонтьева Л. И., Захаров И. С. Синтез и влияние на центральную нервную систему тетрапептида тафцина.— Хим.-фарм. ж., 1981, т. 15, № 1, с. 20–23.
26. Najjar V. A. Therapeutically useful polypeptides.— Pat. USA, 1973, № 3778426. РЖХим. 74: 19H286II.
  27. Stabinsky Y., Gottlieb P., Zakuth V., Spierer Z., Fridkin M. Specific binding sites for the phagocytosis stimulating peptide tuftsin on human polymorphonuclear leukocytes and monocytes.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1978, v. 83, № 2, p. 599–606.
  28. Каменский А. А., Антонова Л. В., Самойлова Н. А., Галкин О. М., Андреев С. М., Ашмарин И. И. Возбуждающее действие тетрапептида туфтсина на активность белых крыс.— Бюл. exper. биол. и мед., 1980, № 7, с. 43–45.
  29. Комарова Т. В., Андреев С. М., Сысоев Ю. А., Рогожин С. В. Синтез и свойства некоторых производных С-концевого тетрапептида гастрина.— В сб.: Тезисы докл. 4-го Всес. симпоз. по химии и физике белков и пептидов. Минск: 1977, с. 159.
  30. Ondetti M. A., Pluščec J., Sabo E. F., Sheehan J. T., Williams N. Synthesis of cholecystokinin-pancreozymin. I. The C-terminal dodecapeptide.— J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 1, p. 195–199.
  31. Gillessen D., Trzeciak A., Müller R. K., Studer R. O. Synthesis and biological activities of methoxinine-analogues of the C-terminal octapeptide of cholecystokinin-pancreozymin.— Int. J. Pept. and Protein Res., 1979, v. 13, № 2, p. 130–136.
  32. Conix A., Smets G. Ring opening in lactam polymers.— J. Polym. Sci., 1955, v. 15, № 79, p. 221–229.
  33. Akiyama M., Yanagisawa J., Okawara M. Synthesis and reactions of functional polymers. XLVI. Preparation and reactions of N-benzoyloxysuccinimide-styrene copolymer.— J. Polym. Sci., 1969, v. 7A-1, № 7, p. 1905–1912.
  34. Fridkin M., Stabinsky Y., Zakuth V., Spierer Z. Tuftsin and some analogs. Synthesis and interaction with human polymorphonuclear leukocytes.— Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 496, № 1, p. 203–211.
  35. Bodanszky M., Natarajan S., Hahne W., Gardner J. D. Cholecystokinin (pancreozymin). 3. Synthesis and properties of an analogue of the C-terminal heptapeptide with serin sulfate replacing tyrosine sulfate.— J. Med. Chem., 1977, v. 20, № 8, p. 1047–1050.
  36. Bodansky M., Natarajan S. Side reactions in peptide synthesis. II. Formation of succinimide derivatives from aspartyl residues.— J. Org. Chem., 1975, v. 40, № 17, p. 2495–2499.

Поступила в редакцию  
27.IV.1981

## HYDROPHILIC POLYMERIC REAGENTS FOR PEPTIDE SYNTHESIS

SAMOILOVA N. A., ANDREEV S. M., GALKIN O. M.,  
DAVIDOVICH Yu. A., ROGOZHIN S. V.

*A. N. Nesmeyanov Institute of Organo Element Compounds,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Hydrophilic crosslinked polymers bearing N-hydroxysuccinimide groupings and, on their basis, N-acylamino acid active esters have been synthesized, which allows the peptide bond formation either in aqueous or organic media. The advantages of such an approach were demonstrated by the synthesis of tuftsin and octapeptide fragment 26-33 of cholecystokinin-pancreozymin.