

УДК 542.91 + 547 III

СИНТЕЗ POLY (Lys – Ser – Glu) МЕТОДОМ АКТИВИРОВАННЫХ ЭФИРОВ

Валиев Р.-ТАУ им. Ш. Шотемур

Ключевые слова: синтез, дипептид, трипептид, олигопептид, полипептид, конденсация.

Классическим методом в растворе синтезировали олиго – и полипептиды, содержащие L – лизин, L – серин и L – глутаминовую кислоту. Общая схема синтеза заключалась в получении активированных эфиров ди – трипептидов последовательным наращиванием C – конца с помощью N,N¹ – дициклогексилкарбодиимида и методом смешанных ангидридов. Олигопептиды получали блочной конденсацией, используя пентафторфенилового эфира трипептида, а полипептиды - путем поликонденсации 2,4,5 – трихлорфениловых эфиров дипептидов. Общий план синтеза полипептидов состоял в получении ди – и трипептидных фрагментов с защищенными функциональными группами аминокислот, содержащих на C – конце остаток глутаминовой кислоты, и их последовательной блочной конденсации методом активированных эфиров. Для получения ди – и трипептидов (I), (V), (VIII), (XIV), (XIX), (XXI), (XXV) и (XXXIII) использовали карбодиимидный метод, трипептиды (III) и (VII) синтезировали, методом смешанных ангидридов (табл. 1).

Таблица 1 - Выход и характеристика синтезированных пептидов характеристика

№	Соединение	Выход %	Агрегатное состояние	Rf			
				А	Б	В	Г
I	Nps- Ser- GLu(OBzl)- OBzl	66	Аморфное	0,9	0,8	0,9	0,8
II	Z-Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl)-OBzl	60	Аморфное	0,9	0,8	0,9	0,9
V	Nps- Ser- GLu(OBzl)- OPfp	65	Маслообразное	0,9	0,9	0,9	0,9
VII	Z-Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl)- OPfp	55	Маслообразное	0,8	0,8	0,9	0,8
VIII	BoC-Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl)-OBzl	60	Аморфное	0,7	0,6	0,7	0,6
X	Z-[Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl)] ₂ -OBz	63	Аморфное	0,9	0,8	0,9	0,9
XIV	BoC-Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl)OPfp	52	Маслообразное	0,9	0,9	0,8	0,8
XV	BoC-[Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl)] ₂ -OBz	55	Маслообразное	0,9	0,9	0,8	0,7
XII	Z-[Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl)] ₃ -OBz	47	Маслообразное	0,7	0,7	0,8	0,7
XIX	Nps- Ser- GLu(OBzl)-OTcp	88	Аморфное	0,8	0,8	0,9	0,9
XXI	BoC-Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl) -OTcp	87	Маслообразное	0,9	0,8	0,5	0,5
XXV	BoC - Lys(Z)- Ser-OTcp	60	Маслообразное	0,9	0,9	0,8	0,7
XXXIII	BoC-Lys(Z)- GLu(OBzl)-OTcp	75	Маслообразное	0,5	0,9	0,8	0,6

Защитные группы выбрали таким образом, что свести к минимуму побочные реакции, при их удалении на промежуточных стадиях синтеза. Для защиты N^α – аминогруппы лизина, а в соединениях (VIII), (XIX), (XX I), (XXV) и (XXXIII) применяли трет – бутило-кискарбонильную группы. Для защиты N^α – аминогрупп серина в дипептидах (I), (V) и глутаминовой кислоты в дипептиде (XIX) использовали о – нитрофенилсульфенильную группу. Боковую функциональную группу лизина блокировали бензилоксикарбонильной группой, а γ – карбоксил глутаминовой кислоты – бензильной. Такое сочетание защитных групп позволяло избирательно удалять их, способ удаления на промежуточных стадиях зависел от природы пептида и блокирующей группы. трет – Бутилоксикарбонил и о – нитрофенилсульфенильную группы удаляли 3 н. раствором хлористого водорода в этилацетате (табл. 2).

Таблица 2 - Выход и характеристика синтезированных хлоргидратов эфиров пептидов

№	Соединение	Получено из соединение	Выход %	Т.пл., °С	Растворители для очистки	Rf	
II	HCl.H- Ser-GLu(OBzl)- OBzl	I	76	аморфное	EtOAc-эфир-гексан	0,44	0,78
VI	HCl.H - Ser- GLu(OBzl)- OPfp	V	64	133-134	EtOAc- эфир	0,13	0,35
IX	HCl.H Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl)-OBzl	VIII	60	аморфное	EtOAc- эфир	0,43	0,35
XVI	HCl.H [Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl)] ₂ -OBz	XV	68	аморфное	Ацетон-гексан	0,31	0,45
XX	HCl.H Ser- GLu(OBzl)-OTcp	X IX	52	аморфное	EtOAc- гексан	0,62	0,70
XX II	HCl.H -Lys(Z)-Ser-GLu(OBzl)-OTcp	XX I	66	аморфное	EtOAc- эфир	0,38	0,45
XXVI	HCl.H Lys(Z)- Ser)-OTcp	XXV	66	аморфное	EtOAc- гексан	0,49	0,47
XXXIV	HCl.H Lys(Z)- GLu(OBzl)-OTcp	XXX III	70	аморфное	EtOAc- эфир	0,55	0,50

Принятые сокращения: DMF – диметилформамид, DCC –N,N¹ – дициклогексилкарбодиимид, Pfp – пентафторфенил, Tsp – 2,4,5 – трихлорфенил, Nps – о – нитрофенилсульфенил, THF – тетрагидрофуран,

Et₃N – триэтиламин, *EtOAc*- этилацетат. Полипептиды (XXIII а), (XX IIIб), (XX IIIв), (XX IIIг), (XX VII), (XXXI) и (XXXV) получены методом активированных эфиров, исходя из соединений (XX), (XXII), (XXVI) и (XXXIV) поликонденсацией в диметилформамиде в присутствии триэтиламина, в течение различного времени (табл.3), с последующим переосаждением из раствора, смесью ,млметанол – эфир (1:3) и высушиванием в вакууме.

Таблица 3. Условия поликонденсации 2,4,5-трихлорфениловых эфиров ди-и трипептидов

№	Защищенный полипептид	Исходный активированный эфир		Время поликонденсации,сут	DMF, мл	Et ₃ N, мл	Выход полимера	
		номер	Кол-во,г				г	%
XXIII а	(Lys(Z)- Ser- GLu(OBzl)) п	XXII	2,00	10	2,00	0,56	1,2	81,0
XX IIIб	То же	XXII	0,80	6	8,80	0,32	0,47	83,9
XX IIIв	-----«-----	XXII	0,80	4	0,80	0,32	0,40	71,4
XX IIIг	-----«-----	XXII	0,80	2	0,80	0,32	0,30	53,5
XX VII	(Lys(Z)- Ser)п	XXVI	1,00	10	1,00	0,41	0,45	76,2
XXXI	(Ser- GLu(OBzl))п	XX	1,00	10	1,00	0,38	0,40	64,5
XXXV	(Lys(Z)- GLu(OBzl))п	XXXIV	1,00	10	1,00	0,30	0,45	68,1

Бензилоксикарбонильную и бензильную группы удаляли гидрогенолизом над палладиевой чернью. Попытка удаления аналогичным способом защиты с пептида (XX III а) не дала желаемых результатов, защитные группы снимались не полностью. Это удалось лишь при последующей обработке бромистым водородом в ледяной уксусной кислоте. Полноту удаления защитных групп контролировали с помощью БХ, УФ – и ИК-спектроскопии. Исчезновение характерных пиков в области 700 -740 см⁻¹ свидетельствует о полноте удаления бензильных групп.

Среднюю относительную молекулярную массу соединений (XXIV а-г), полученных соответственно из соединений (XX III а- г), определяли на калиброванной колонке с сефадексом G-50. Среднюю молекулярную массу соединений (XXVIII), (XXXII) и (XXXVI) определяли методом Ван – Слайка.

Экспериментальная часть. В работе использовались L – аминокислоты, выпускаемые фирмами Chemapol (Чехия) и Reanal (Венгрия) . Производные аминокислот получали по описанным методикам [10,11]. ТСХ проводили на пластинках силуфол в системах: н- бутанол – вода – уксусная кислота, 4:1:1(А); н- бутанол – вода – пиридин – уксусная кислота, 30:24:20:6 (Б); толуол – диоксан – гептан – этанол, 10:6:3:1 (В); толуол – диоксан – гептан – уксусная кислота, 10:6:3:1 (Г). Вещества на хроматограммах обнаруживали нингидрином и парами иода. Бумажную хроматографию проводили на бумаге watman № 2 (Англия) в системе: н- бутанол – вода – уксусная кислота, 4:1:1. Температуру плавления определяли на приборе Voetius (Германия). В работе использовали HCl.H GLu(OBzl)-OTcp, HCl.H GLu(OBzl)OPfp, HCl.H Ser- GLu(OBzl)-OTcp, которые получали согласно [12,13].

Nps- Ser- GLu(OBzl)- OBzl(1). К раствору 1,0 г (3,8ммоль) Nps- Ser- OH в 20 мл THF при – 15° С прибавляли 0,79г (3,8 ммоль) DCC. Через 10 мин прибавляли 1,4г (3,8 ммоль) HCl.H GLu(OBzl)- OBzl и 0,54 мл (3,8 ммоль) триэтиламина. Перемешивали 2 ч при -5°С и 4ч при 20°С. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 20 мл этилацетата, охлаждали, отфильтровывали выпавшую дициклогексилмочевину и фильтрат промывали 1 н. H₂SO₄ (3X 10мл), H₂O (2 X10мл), 0,5% Na₂ SO₄ и упаривали. Получили 1,0 г соединения (1). Аналогично карбодиимидным методом наращиванием с С – концом получали соединения (V), (VIII), (XIV), (XIX), (XXI), (XXV), (XXXIII) (табл.1). При обработке соединений (VIII), (XXI), (XXV) и (XXXIII) вместо 1 н. H₂SO₄ использовали 10% лимонную кислоту, а при обработке соединений (V) и (XIV) промывание 0,5% NaHCO₃ не проводили.

HCl.H-Ser- GLu(OBzl)-OBzl(II). 2,6 г (5,7ммоль) дипептида (I) растворяли в 10 мл этилацетата, добавляли 3,7мл 3н. раствора хлористого водорода в этилацетате и смесь выдерживали 40 мин при 20°С. Продукт осаждали абс. эфиром. Выпавший осадок растворяли в 15 мл этилацетата и осаждали 123 мл смеси гексан – эфир (2 :1), а затем сушили в вакууме. Получили 1,0 г соединения (II). Аналогично получали соединения (VI), (IX), (XVI), (XX), (XX II), (XXVI), (XXXIV) (табл.2). При получении соединения (IX), (XVI), (XX II), (XXVI) и (XXXIV) брали 5 – кратный избыток 3н.раствора хлористого водорода в этилацетате.

Z-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OBzl (III). Раствор 1,15г (2,8ммоль) *Z-Lys(Z)-OH* в 20 мл THF с 0,39мл (2,8ммоль) триэтиламина охлаждали до -10 -15°C и добавляли 0,37мл (2,8ммоль) изобутилхлороформиата. Через 2 мин добавляли раствор 1,29г (2,8ммоль) соединения (II) в 15мл тетрагидрофурана с 0,39мл (2,8ммоль) триэтиламина, охлажденный до той же температуры. Реакционную смесь перемешивали 4 ч при -10 -15°C и 2ч при 20°C, затем THF упаривали, остаток растворяли в 30 мл этилацетата и промывали 1н. H₂SO₄ (3X10мл), H₂O (2X 10мл), 0,5% NaHCO₃ (3X10мл) и H₂O (2X 10мл), сушили безводным Na₂SO₄ и упаривали. Получили 1,3г соединения (III).

Z-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-O Pfp (VII). 0,79г(1,9ммоль) *Lys(Z)-OH* в 10 мл THF с 0,25 мл (1,9ммоль) триэтиламина охлаждали до - 20°C и добавляли 0,25мл (1,9ммоль) изобутилхлороформиата. Через 2мин добавляли раствор 1,3г(1,9ммоль) соединения (VI) (табл.2) в 10мл THF с 0,25мл (1,9ммоль) триэтиламина, охлажденный до той же температуры. Реакционну смесь перемешивали 2 ч при -20 -15°C и 2ч при 20°C, затем THF упаривали, остаток растворяли в 25мл этилацетата и промывали H₂O (2X 10мл), 0,5% KHCO₃ (2X10мл) и H₂O (2X 10мл), сушили безводным Na₂SO₄ и упаривали. Выпавший маслообразный продукт сушили в вакууме. Получили 0,85г соединения (VII).

Z-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl)-OBzl(X). 0,68г (0,77ммоль) соединения (VII) растворяли в 15 мл DMF, добавляли 0,54г (0,77ммоль) триэтиламина и перемешивали 2 сут при 20°C, затем упаривали, остаток растворяли в 25 мл этилацетата и промывали 1н. H₂SO₄ (3X10мл), H₂O (2X 10мл), 0,5% NaHCO₃ (3X10мл) и H₂O (2X 10мл), сушили безводным Na₂SO₄ и упаривали. Получили 0,60 г соединения (X). Аналогично из соединений (XIV) и (IX) получали соединение (XV) и из соединений (XIV) и (XVI) – соединение (XVII) (табл.1).

(Lys(Z)-Ser-Glu(OBzl))_n (XXIII a). Раствор 2,10г (2,6 ммоль) соединения (XXII) в 2 мл DMF смешивали с 0,56 мл (2,6 ммоль) триэтиламина и оставляли в запаянной ампуле на 10 сут при комнатной температуре. Продукт осаждали смесью метанол – эфир (1:3). Осадок промывали этой же смесью (3X10мл). Получали 1,2 г соединения (XXIII a). Аналогично получали соединения (XXIII б), (XXIII в), (XXIII г) с различными временем поликонденсации (6,4 и 2 сут соответственно), а также соединения (XXVII), (XXXI) и (XXXV) (табл.3).

H-Lys-Ser-Glu-OH (IV). 0,35г (0,9 ммоль) соединения (III) растворяли в 15 мл смеси уксусная кислота – диоксан – этилацетата (1:1:1) и гидрировали 48ч в слабом токе водорода над Pd – чернью. Затем катализатор отфильтровывали и филтрат упаривали в вакууме. Полученный продукт переосаждали из этанола абс. эфиром. Получили 0,09г соединения (IV). Аналогично из соединения (X) получали (XI) и из (XVII)- (XVIII), из соединений (XXIII б-г) – соединения (XXIVб-г), из (XXVII)-(XXVIII) и из (XXXV)-(XXXVI) (табл.2).

Снятие защитных групп в процессе гидрирования контролировали с помощью ИК – УФ – спектроскопии и БХ. Пробы из реакционной смеси отбирали через каждые 10 ч. Однако в случае получения соединения (XXIVa), спустя 50 ч гидрирование еще не закончилось, хотя 2 раза пришлось добавлять свежую порцию катализатора. Поэтому смесь после гидрирования подвергали дополнительному гидроброминолизу. 1,0 г смеси растворяли в ледяной СН₃COOH и пропускали ток бромистого водорода в течение 40 мин при комнатной температуре. Продукт осаждали абс. эфиром. Выпавший осадок переосаждали из ацетона абс. эфиром. Получали 0,8 г водорастворимого соединения (XXIVa).

ЛИТЕРАТУРА

1. Валиев Р.// Кишоварз,2019. №2 (82), - С.20-24
2. Валиев Р. Кишоварз,2019. №3 - А (84), - С.58-61
3. Порошин К.Т., Шибнев В.А.Синтез полиаминокислот и регулярных полипептидов. Душанбе: Дониш, 1968.
4. Халиков Ш.Х., Исмаилов М.И., Валиев Р. // Химия природ. соедин. 1982. №1. С.91 -96.
5. Халиков Ш.Х., Исмаилов М.И., // Изв. АН Тадж.ССР. 1979.№4.С.117 – 119.
6. Valentine D., Scott J.W., // Synthesis 392. 1978.

АННОТАЦИЯ

СИНТЕЗИ POLY (Lys – Ser – Glu) БО УСУЛИ ЭФИРҲОИ ФАЪОЛ

Бо усули классикӣ синтези олиго – ва полипептидҳои L – лизин, L – серин ва L – кислотаи глутамат дошта, дар маҳлул синтез карда шуд. Роҳи умумии синтез дар ҳосилкунии эфирҳои фаъоли ди – трипептидҳо ва зиёдшавӣ аз C – канор бо ёрии N,N¹ – дисиклогексилкарбодиимид ва усули ангидридҳои омехта асос ёфтааст. Олигопептидҳо бо конденсатсияи гурӯҳӣ бо ёрии эфирҳои пентафторфенили ва полипептидҳо бошад хангоми поликонденсатсияи эфирҳои 2,4,5 – трихлорфенилии дипептидҳо ҳосил карда шуд.

ANNOTATION

SYNTHESIS OF POLY (Lys – Ser – Glu) BY THE METHOD OF ACTIVATED ETHERS

We have synthesized oligo-and polypeptides containing lysin, serin and glutamic acid residues. Di – and tripeptides were prepared by the successive elongation of C-terminus by means of the N,N¹-dicyclohexylcarbodiimide or mixeds anhydride methods. The oligopeptides were obtained by block condensation of pentafluorophenyl esters of tripeptides, and polypeptides by policondensation of dipeptide 2,4,5-trichlorophenyl esters.

Key words: synthesis, dipeptide, tripeptides, oligopeptide, policondensation.

Сведения об авторе:

Валиев Рахматулло, кандидат химических наук, доцент кафедры химии, Таджикского аграрного университета им. Ш.Шотемур, E- mail: Valizoda – 12 @ mail.ru, тел. 933 27 99 11.