



УДК 547.466'26.057

АКТИВАЦИЯ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ПИРОКАРБОНАТАМИ.  
ПРАКТИЧНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА *o*-НИТРОФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ  
*N*-*трет*-БУТИЛОКСИКАРБОНАМИНОКИСЛОТ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ ДИ-*трет*-БУТИЛПИРОКАРБОНАТ—  
ПИРИДИН В КАЧЕСТВЕ КОНДЕНСИРУЮЩЕГО РЕАГЕНТА

Позднев В. Ф., Подгорнова Н. Н.\*, Якайте И. К.\*,  
Калей В. О.\*

Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР, Москва;

\* Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной биохимии,  
Олайне, ЛатвССР

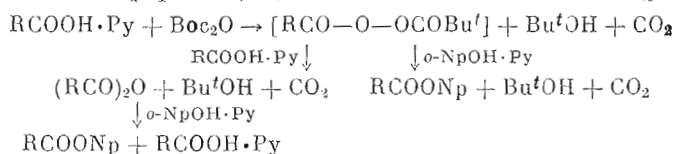
Предложен новый метод синтеза *o*-нитрофениловых эфиров Вос-аминокислот — ключевых полупродуктов для пептидного синтеза. Метод характеризуется простотой, доступностью исходных реагентов, высокими выходами целевых продуктов и хорошим их качеством при минимальной очистке, в связи с чем может быть рекомендован для использования в промышленности.

Успешное развитие промышленного производства биологически активных пептидов медицинского и сельскохозяйственного назначения в значительной мере определяется доступностью исходных полупродуктов, в частности активированных эфиров защищенных аминокислот. Среди большого числа применяемых в пептидном синтезе активированных эфиров наибольший практический интерес представляют *o*- и *n*-нитрофениловые эфиры, поскольку они хорошо изучены, достаточно устойчивы при хранении и необходимые для их синтеза нитрофенолы доступны. Хотя *o*-нитрофениловые эфиры более активны в реакциях образования пептидной связи [1—3], применяются они реже, чем *n*-нитрофениловые эфиры, что, по-видимому, объясняется трудностями их синтеза традиционными методами. Специфика пространственного строения *o*-нитрофенола затрудняет ацилирование его *N*-ациламинокислотами с помощью дициклогексилкарбодиимида в обычных растворителях [2], и удовлетворительные результаты можно получить лишь при проведении реакции в чистом пиридине [2—4]. Но и в этом случае целевые продукты приходится очищать колоночной хроматографией [3, 4], что, конечно, усложняет процесс. Если также учесть, что применение дициклогексилкарбодиимида в промышленных условиях осложняется его вредными физиологическими свойствами, то поиск более эффективных и доступных конденсирующих реагентов для синтеза активированных эфиров *N*-защищенных аминокислот вообще и *o*-нитрофениловых эфиров в частности является актуальной и практически важной задачей.

В связи с этим представляло интерес изучить возможность синтеза *o*-нитрофениловых эфиров с помощью системы Вос<sub>2</sub>O — пиридин [5—8]. Известно, что при использовании этой системы в качестве конденсирующего реагента выходы ариловых эфиров тем выше, чем ниже нуклеофильность фенола [6]. Поскольку нуклеофильность *o*-нитрофенола несколько понижена за счет образования внутримолекулярной водородной связи, можно было ожидать, что он будет реагировать с Вос<sub>2</sub>O в меньшей степени,

Сокращения: Вос<sub>2</sub>O — ди-*трет*-бутилпирокарбонат; DCC — *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид; DMF — диметилформамид; Py — пиридин; Tfa — трифторацетил; ForM — формил; *o*-Np — *o*-нитрофенил; Bu<sup>t</sup>OH — *трет*-бутиловый спирт.

чем защищенная аминокислота, и будет в основном превращаться в *o*-нитрофениловый эфир защищенной аминокислоты по следующей схеме:



где R — остаток Woc-аминокислоты.

Действительно, оказалось, что при проведении процесса в режиме с предварительным накоплением смешанного ангидрида [8] с последующим постепенным добавлением в реакционную среду раствора *o*-нитрофенола Woc-аминокислоты практически полностью превращаются в *o*-нитрофениловые эфиры. Woc<sub>2</sub>O и *o*-нитрофенол при этом берутся в избытке (15—20%), и избыток их в конечном итоге превращается в *трет*-бутил-*o*-нитрофенилкарбонат. Не исключено, что последний может образовываться и при взаимодействии смешанных ангидридов с *o*-нитрофенолом.

Кроме высокой степени этерификации Woc-аминокислот весьма существенным обстоятельством, также обеспечивающим успешное применение системы Woc<sub>2</sub>O — пиридин именно для получения *o*-нитрофениловых эфиров, является тот факт, что *трет*-бутил-*o*-нитрофенилкарбонат хорошо растворяется в петролейном эфире. Поэтому он легко удаляется при кристаллизации целевых продуктов, что существенно облегчает их очистку.

В отличие от метода с использованием дициклогексилкарбодиимида синтез *o*-нитрофениловых эфиров с помощью системы Woc<sub>2</sub>O — пиридин менее чувствителен к влиянию растворителя. При использовании Woc<sub>2</sub>O реакцию можно проводить в диоксане, тетрагидрофуране, бензоле, диметилформамиде или этилацетате. Этилацетат оказался наиболее удобным в технологическом отношении, и, кроме того, он доступнее в очищенном состоянии, хотя в диоксане или диметилформамиде реакции идут несколько быстрее. Пиридин при этерификации с помощью Woc<sub>2</sub>O играет существенную роль и является одновременно и основанием и катализатором — переносчиком ацильных групп. В процессе реакции он не расходуется и не нейтрализуется, поэтому количество его строго не лимитируется и может быть менее 1 экв.

Ход реакции можно контролировать по количеству выделяющегося CO<sub>2</sub>. Однако прекращение выделения CO<sub>2</sub>, которое происходит через 5—7 ч, еще не свидетельствует об окончании реакции, так как после этого еще могут оставаться непрореагировавшие симметричные ангидриды. Поэтому обычно смесь оставляли на 16—20 ч. Выделение и предварительную очистку *o*-нитрофениловых эфиров Woc-аминокислот производили путем промывок их растворов в этилацетате водными растворами бикарбоната и разбавленной кислоты, а окончательную очистку — растиранием в нескольких порциях петролейного эфиро, иногда с добавлением диэтилового эфиро. В тех случаях, когда целевые продукты трудно кристаллизовались, их очищали хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента смесь петролейного эфиро с этилацетатом. *o*-Нитрофениловые эфиры Woc-изолейцина и Woc-валипа в кристаллическом состоянии получить не удалось. В случае остальных аминокислот *o*-нитрофениловые эфиры получены в кристаллическом состоянии с физико-химическими характеристиками, соответствующими аналитически чистым образцам, и выходами, как правило, более высокими, чем при использовании дициклогексилкарбодиимида [3] (таблица). При этом для получения всего ряда продуктов, представленных в таблице, была использована одна общая методика (см. «Экспериментальную часть»). Кроме описанных ранее нами синтезировано несколько новых соединений, представляющих интерес для пептидного синтеза. Это *o*-нитрофениловые эфиры N<sup>α</sup>-Woc-лизина с различными N<sup>ε</sup>-защитными группировками, N-Woc, O-Woc-тирозина, N<sup>α</sup>-Woc, N<sup>im</sup>-Woc-гистидина и Woc-4-нитрофенилаланина. В то же время необходимо отметить, что *o*-нитрофениловые эфиры Woc-аспарагина, Woc-глутамина и N<sup>α</sup>-Woc, N<sup>G</sup>-нитроаргинина по новой методике образуются неудов-

**Выходы и физико-химические характеристики *o*-нитрофениловых эфиров  
Вос-аминокислот**

Вос-Амино- кислота	Выход, %	Т. пл., °С	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> *	R <sub>f</sub>	Лит. данные [3]:		
					выход, %	т. пл., °С	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> *
γ-Abu	87	93-95	—	0,52	—	—	—
Ala	85	86-89	-75	0,60	61	86-87	-79
Cys(Bzl)	85	100-101	-74	0,72	77	103-105	-74
Glu(Bzl)	70	123-124	-52	0,56	86	124-125	-54
Gly	86	96-97	—	0,54	78	96-98	—
His(Вос)	80	104-106	-34	0,49	—	—	—
Ile	72	—	—	0,73	99	—	-37
Leu	74	55-56	-69	0,73	—	56-57	-68
Lys(Z)	83	103-105	-40	0,45	—	—	—
Lys(Tfa)	85	138-140	-39	0,45	—	—	—
Lys(Form)	76	116-117	-52	0,43	—	—	—
Met	84	104-105	-71	0,60	78	104-105	-73
Phe	76	145-146	-64	0,65	57	146-146,5	-65
Pro	78	63-67	-85	0,70	—	63-70	-84
Trp	73	153-157	-57	0,40	53	155-156	-62
Tyr(Вос)	80	131-132	-43	0,65	—	—	—
Phe(4-NO <sub>2</sub> )	75	150-151	-80	0,58	—	—	—
Val	70	—	—	0,73	—	53-56	-44

\* с 1; DMF, содержащий 1% АсОН.

летворительно, с большим количеством примесей. Несмотря на эти немногочисленные исключения, мы считаем, что простота, доступность реагентов, высокие выходы целевых продуктов и хорошее их качество при минимальной очистке делают новый метод синтеза *o*-нитрофениловых эфиров Вос-аминокислот перспективным для промышленного использования.

### Экспериментальная часть

В работе использованы реагенты отечественного производства. Этилацетат марки х.ч. применяли без дополнительной очистки. Пиридин высушивали над таблетированным КОН, перегоняли и хранили над КОН. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 в системе бензол — гептан — ацетон (5:3:2), детектирование — раствором нингидрина в смеси *n*-бутиловый спирт — муравьиная кислота (9:1) с последующим нагреванием. Удельное оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer 241 (Швеция). Температуры плавления определяли в открытых капиллярах и не исправляли. Все новые соединения охарактеризованы элементным анализом на С, Н, N; полученные значения соответствовали вычисленным.

#### Общая методика получения *o*-нитрофениловых эфиров Вос-аминокислот.

Раствор 10 мМ Вос-аминокислоты, 0,5 мл пиридина и 12—13 мМ Вос<sub>2</sub>O в 7—10 мл этилацетата перемешивали при 18°С ~ 1 ч, затем в течение 1 ч добавляли по каплям раствор 13 мМ *o*-нитрофенола в 5 мл этилацетата и смесь перемешивали 16—20 ч. Разбавляли этилацетатом до 50 мл, промывали водой, 0,5 М раствором NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 М раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, водой, высушивали MgSO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме при 40°С. Остаток кристаллизовали растиранием в петролейном эфире, кристаллический осадок промывали на фильтре гексаном и высушивали в вакууме. Результаты представлены в таблице.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Bodanszky M. Nature, 1955, v. 175, № 4459, p. 685.
2. Bodanszky M., Fink M. L., Funk K. W., Lin C. Y., Kondo M., Bodanszky A. J. Amer. Chem. Soc., 1974, v. 96, № 7, p. 2234—2240.
3. Bodanszky M., Funk K. J. Org. Chem., 1973, v. 38, № 7, p. 1296—1302.
4. Bodanszky M., Funk K. W., Fink M. L. J. Org. Chem., 1973, v. 38, № 20, p. 3565 — 3570.
5. Позднев В. Ф. Журн. орган. химии, 1983, т. 19, № 4, с. 882.
6. Позднев В. Ф., Черная М. Ю. Химия природн. соедин., 1984, № 3, с. 357—362.
7. Позднев В. Ф. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 7, с. 912—920.
8. Позднев В. Ф. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 583—589.

Поступила в редакцию  
4.XI.1985

ACTIVATION OF CARBOXYLIC ACIDS BY PYROCARBONATES. A PRACTICAL  
METHOD FOR SYNTHESIS OF *o*-NITROPHENYL ESTERS OF *N*-*TERT*-  
BUTYLOXYCARBONYL AMINO ACIDS USING DI-*TERT*-BUTYLPYROCARBONATE —  
PYRIDINE SYSTEM AS CONDENSING REAGENT

POZDNEV V. F., PODGORNOVA N. N.\*, JAKAJTE I. K.\*, KALEJ U. O.\*

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical  
Sciences of the USSR, Moscow; \* All-Union Scientific Institute  
of Applied Biochemistry, Olajne*

A new method for preparing *o*-nitrophenyl esters of Boc amino acids — key intermediates in peptide synthesis, is reported. The method is characterized by simplicity, availability of starting reagents, high yield of aim products and their good quality even after minimal purification; therefore, it can be recommended for use in industry.