



УДК 541.128.1 + 577.15.02

© 1993 г. А. Н. Семенов, И. В. Ломоносова

СИНТЕЗ ЧАСТИЧНО ЗАЩИЩЕННОГО ФРАГМЕНТА 1—16
КАЛЬЦИТОНИНА ЛОСОСЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ФЕНИЛГИДРАЗИДНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ*Совместное российско-германское предприятие «Константа», Москва*

Методом классического пептидного синтеза в растворе получен частично защищенный ключевой 1—16-фрагмент кальцитонина лосося:

$\text{Hoc-Cys(Asm)-Ser(Bu')-Asn-Leu-Ser(Bu')-Thr(Bu')-Cys(Asm)-Val-Leu-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser(Bu')-Gln-Glu(OBu')-Leu-OH}$.

Синтез проводили конденсацией фрагментов 1—6, 7—9, 10—12 и 13—16. Фрагменты синтезировали карбодимидным методом с использованием фенилгидразидной группы в качестве временной защиты для карбоксильной функции С-концевой аминокислоты. Фенилгидразидную защитную группу удаляли каталитическим окислением кислородом воздуха, причем в качестве катализатора использовали комплекс меди с пиридином. Конденсацию фрагментов осуществляли методом DCC/HOBt по схеме (6 + 3) + (3 + 4). Предлагаемая схема позволяет получать защищенный фрагмент 1—16 кальцитонина лосося в препаративных количествах.

Кальцитонин — гормон пептидной природы, регулирующий обмен кальция и, по-видимому, противостоящий паратиреоидному гормону. Кальцитонины различных видов, а также их неприродные аналоги используются в виде фармакологических препаратов [1].

В литературе описано несколько примеров синтеза кальцитонина в растворе. Практически все они выполнены по схеме, включающей синтез фрагментов с метиловыми эфирами в качестве временной защитной группы для карбоксильной функции С-концевой аминокислоты фрагментов и последующую конденсацию фрагментов азидным методом. Некоторые фрагменты были синтезированы с незащищенной карбоксильной группой С-концевой аминокислоты, и для их конденсации использовали метод DCC/HOSu [2—5]. Иная схема синтеза кальцитонина человека, использованная Вюншем [6], состояла в получении методом активированных эфиров всех фрагментов с открытой С-концевой карбоксильной группой и их последовательной конденсации начиная с С-конца методом DCC/HOSu.

В настоящей работе мы представляем новую схему синтеза ключевого фрагмента 1—16 кальцитонина лосося в частично защищенном виде.

Схема включает в себя предварительный синтез 4 фрагментов, причем карбоксильная функция С-концевой аминокислоты каждого фрагмента блокирована фенилгидразидной защитной группой. После удаления С-концевой фенилгидразидной защитной группы осуществляли конденсацию фрагментов методом DCC/HOBt по схеме (6 + 3) + (3 + 4) (см. схему).

Фенилгидразидная защитная группа, известная еще с 50-х годов, не получила широкого распространения в практике пептидного синтеза. Это связано главным образом с тем, что снятие этой защиты протекает в жестких окислительных условиях. В предыдущих работах мы показали, что для мягкого удаления фенилгидразидной защитной группы в мягких окис-

Используемые сокращения: Asm — ацетамидометил-, HOBt — N-гидроксисбензотриазол, HOSu — N-гидроксисукцинимид.

Условия синтеза, выход и характеристики фрагментов кальцитонина

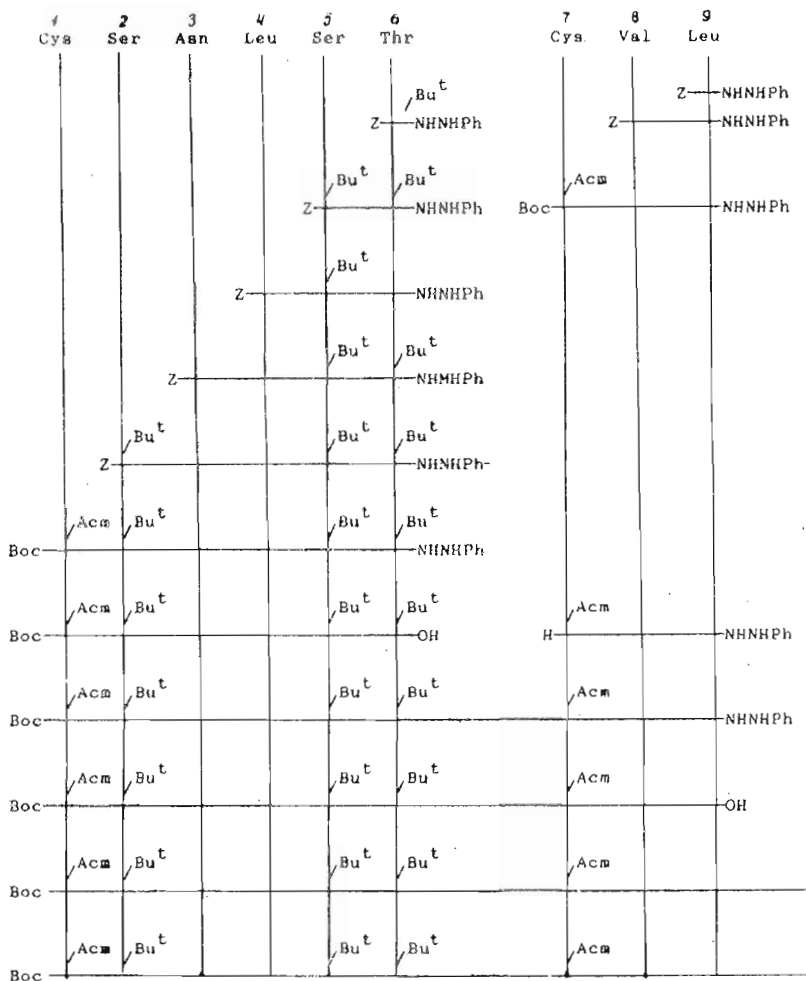
Пептид	Синтетическая процедура	Растворитель для кристаллизации	Выход, %	R _f **
(I)	A*	Этилацетат/гексан	97	0,69 (1)- 0,84 (2) 0,86 (3)
(II)	A*	То же	86	0,44 (1) 0,79 (2) 0,86 (3)
(III)	A*	*	97	0,59 (1) 0,81 (2) 0,78 (3)
(IV)	B	Эфир	99	0,23 (1) 0,58 (2) 0,16 (3)
(V)	B	*	87	0,12 (1) 0,64 (2) 0,12 (3)
(VI)	B	*	92	0,07 (1) 0,44 (2) 0,09 (3)
(VIII)	A*	Этилацетат/гексан	77	0,61 (1) 0,79 (2) 0,77 (3)
(IX)	A*	То же	82	0,63 (1) 0,82 (2) 0,70 (3)
(X)	A*	Эфир/гексан	90	0,21 (1) 0,53 (2) 0,23 (3)
(XIV)	A*	Этилацетат/гексан	96	0,56 (1) 0,81 (2) 0,60 (3)
(XV)	A*	То же	84	0,30 (1) 0,62 (2) 0,40 (3)
(XVII)	A*	*	96	0,55 (1) 0,77 (2) 0,79 (3)
(XVIII)	B	Ацетон	88	0,12 (1) 0,59 (2) 0,14 (3)
(XIX)	A***	Эфир/ВuOH	58	0,16 (1) 0,57 (2) 0,88 (4)

* При выделении продукт промывали в этилацетате.

** Для ТСХ использовали следующие системы: хлороформ — метанол — уксусная кислота, 32 : 2 : 1 (1); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 18 : 2 : 1 (2); хлороформ — метанол — этилацетат, 6 : 1 : 3 (3); хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 20 : 15 : 2 : 2 (4).

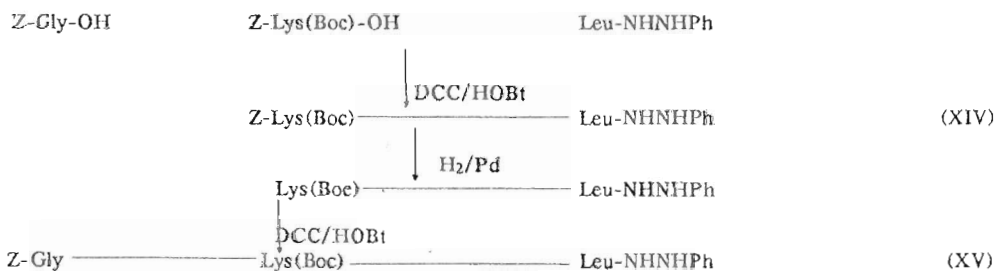
*** При выделении продукт промывали в смеси СНCl₃ — ВuOH.

лительных условиях можно использовать ферменты класса оксидоредуктаз — пероксидазу или лакказу (в случае водорастворимых пептидов) [7] или комплекс меди с азотсодержащими лигандами, имитирующий активный центр лакказы (в случае водонерастворимых пептидов) [8]. Каталитические реакции протекают в мягких условиях, исключая удаление других защитных групп или окисление таких лабильных аминокислот, как метионин, триптофан или тирозин. Разработанный нами способ мягкого каталитического окислительного удаления фенилгидразидной защитной группы

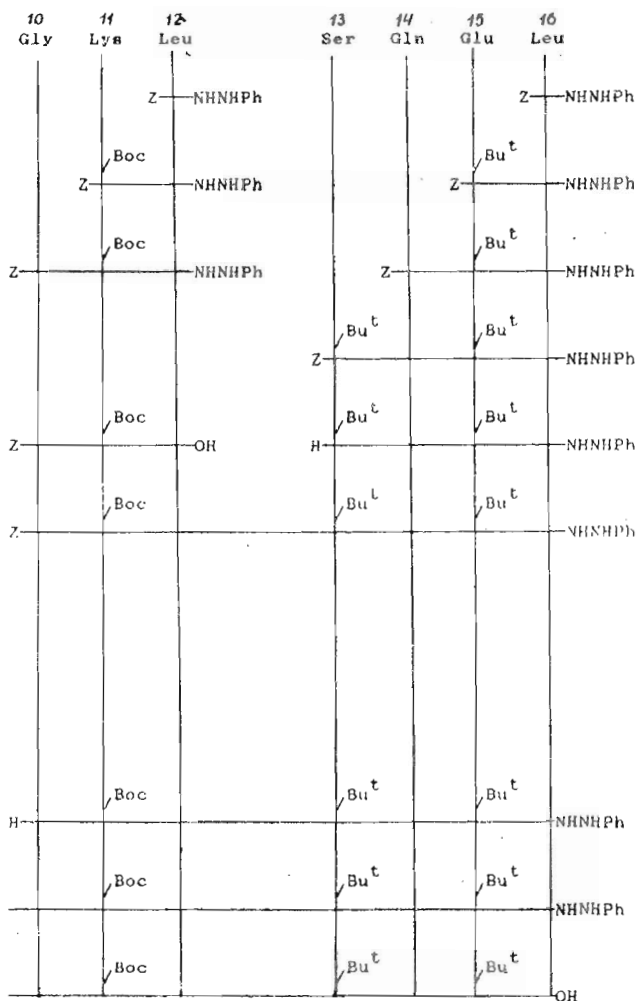


и позволил нам реализовать новую схему синтеза ключевого фрагмента 1—16 кальцитонина лосося.

Синтез фрагментов. При наличии фенилгидразидной группы, блокирующей карбоксильную функцию С-концевой аминокислоты каждого фрагмента, синтез фрагментов легко осуществляется ступенчатым наращиванием пептидной цепи методом DCC/HOBt, например в случае фрагмента 10—12:



В большинстве случаев конденсация протекает достаточно гладко, без побочных реакций и с высоким выходом (см. табл. 1). Фенилгидразидная защитная группа полностью устойчива на всех стадиях синтеза (каталитическое гидрирование,



кислотное деблокирование), а также при хранении промежуточных соединений при комнатной температуре на воздухе. Все пептиды, содержащие фенилгидразид как С-концевую защитную группу, хорошо кристаллизуются. Отсутствие побочных реакций и высокая степень превращения исходных реагентов практически на всех стадиях позволяют существенно упростить процедуры обработки реакционных смесей и выделения продуктов. Для проведения всех 12 стадий при синтезе фрагментов были использованы только 2 стандартные синтетические процедуры (см. табл. 1 и «Экспериментальную часть»). Таким образом, синтез фрагментов превращается в рутинную процедуру, которая к тому же легко поддается масштабированию.

В настоящей работе в качестве конденсирующего агента использовали только DCC. Разумеется, могут быть использованы и другие методы конденсации. Следует тем не менее отметить одно ограничение. Недавно было показано, что в присутствии хлорида меди(II) существенно подавляется рацемизация при синтезе карбодиимидным методом [9]. Очевидно, что при наличии фенилгидразидной защитной группы применение этого подхода исключается.

Удаление фенилгидразидной защитной группы. В предыдущей работе [8] мы показали, что удаление фенилгидразидной защитной группы легко осуществить

Содержание D-аминокислот в кислотном гидролизате целевого пептида (XXIII) по данным газохроматографического анализа [11]

D-Аминокислота	Содержание D-изомера, %	D-Аминокислота	Содержание D-изомера, %
Val	< 0,5	Ser	< 0,5
Thr	< 0,5	Asx	< 0,5
Leu	1,6	Glx	1,3

путем каталитического окисления кислородом воздуха, причем в качестве катализатора можно использовать комплексы меди с такими азотсодержащими лигандами, как пиридин, имидазол, N-метилимидазол. Наиболее активными в модельных экспериментах были комплексы меди с имидазолом и N-метилимидазолом. Тем не менее для препаративного деблокирования в качестве лиганда мы выбрали пиридин по следующим причинам: а) в случае пиридина, в отличие от имидазола, отсутствует ингибирование избытком лиганда [8]; б) после окончания реакции большая часть лиганда может быть удалена из реакционной смеси упариванием в вакууме.

Оптимальные условия деблокирования, предложенные нами в работе [8], были разработаны на примере модельного соединения — фенилгидразида N-защищенной аминокислоты Z-Ser. Однако эти условия оказались также пригодными и для деблокирования длинных пептидов, вплоть до гексадекапептида. Единственное отличие от предложенной ранее методики заключалось в том, что в случае гексадекапептида ввиду его низкой растворимости в DMF в качестве растворителя использовали диметилсульфоксид. Во всех случаях снятие фенилгидразидной защитной группы протекает с высоким выходом без побочных реакций. Тем не менее следует заметить, что скорость деблокирования резко снижается с увеличением длины деблокируемого пептида.

Конденсация фрагментов. Конденсацию фрагментов осуществляли методом DCC/NOBt. В большинстве случаев реакция проходит с удовлетворительным выходом, побочные процессы, по данным ТСХ, отсутствуют. В качестве растворителя использовали DMF, за исключением последней конденсации: 9 + 7. На этой стадии использовали смесь DMF — диметилсульфоксид (1 : 1) из-за низкой растворимости исходных фрагментов в чистом DMF. Выбор позиции Leu9-Gly10 для заключительной конденсации был обусловлен тем, что глицин — наименее пространственно затрудненный нуклеофил и, следовательно, можно было рассчитывать, что реакция аминлиза активированного пептида 1—9 будет превалировать над реакцией рацемизации C-концевого лейцина [10].

По данным ГЖХ (см. табл. 2), процесс рацемизации как при синтезе фрагментов, так и при их конденсации практически отсутствует.

Заключение. В настоящей работе мы продемонстрировали возможность использования разработанного в нашей лаборатории способа мягкого удаления фенилгидразидной защитной группы в практике пептидного синтеза на примере синтеза фрагмента 1—16 кальцитонина лосося. Фенилгидразидная защита полностью устойчива в условиях гидронолиза бензилоксикарбонильной и ацидолитического отщепления трет-бутилоксикарбонильной защитных групп. В то же время ее удаление протекает в мягких условиях, исключая деблокирование остальных функциональных групп или окислительную модификацию аминокислот. Благодаря этим свойствам фенилгидразидная защитная группа, по нашему мнению, может найти применение при синтезе фрагментов в качестве временной защиты карбоксильной функции C-концевой аминокислоты.

Следует также отметить, что внедрение в практику пептидного синтеза защитной группы, удаляемой в мягких окислительных условиях, способствует построению полностью ортогональной системы защитных групп для карбоксильной функции:



Экспериментальная часть

Все аминокислоты и их производные были *L*-конфигурации. В работе использовали аминокислоты и их производные, дициклогексилкарбодиимид, *N*-гидроксисбензотриазол, триэтиламин, карбобензоксихлорид, палладий на угле (5% Pd) производства Fluka AG (Швейцария), органические растворители, неорганические соли, фенилгидразин — производства «Реахим» (СССР).

Фенилгидразиды *N*-защищенных аминокислот синтезировали методом DCC/HOBt исходя из бензилоксикарбониламино кислот и фенилгидразина.

Газохроматографическое определение энантиомеров аминокислот в гидролизате проводили на стеклянной капиллярной колонке с хиральной фазой типа Хирасил в режиме температурного программирования [11].

Аминокислотный анализ осуществляли методом, описанным в работе [12].

Для синтеза фрагментов в большинстве случаев использовали две стандартные синтетические процедуры — А и В.

Синтетическая процедура А. Бензилоксикарбонильное производное аминокомпонента гидрировали в метаноле с использованием 5% палладия на активированном угле в качестве катализатора. По окончании гидрирования катализатор отфильтровывали, раствор упаривали досуха, растворяли в DMF, добавляли 10 мол. % HOBt и эквивалентные количества *N*-ациламино кислоты (карбоксильного компонента) и DCC, выдерживали 24 ч при 0° С, дициклогексимочевину отфильтровывали, растворитель упаривали в вакууме при 40° С, остаток растворяли в этилацетате или смеси CHCl₃ — BuOH (5 : 1) и промывали последовательно 1 н. H₂SO₄, водой, 5% NaHCO₃ и водой до нейтральной реакции, упаривали и остаток кристаллизовали.

Синтетическая процедура В. Аналогична процедуре А, но после упаривания DMF стадию промывания опускали и остаток кристаллизовали в соответствующем растворителе.

H-Cys(Actm)-Val-Leu-NHHPPh·HCl (XI). 2,656 г (5 ммоль) пептида (X) суспендировали в 100 мл 2 н. HCl в этилацетате при интенсивном перемешивании. Через 3 ч реакционную смесь упаривали в вакууме и остаток кристаллизовали из смеси Pr^tOH/эфир. Выход 2,234 г (84%).

Woc-Cys(Actm)-Ser(Bu^t)-Asn-Leu-Ser(Bu^t)-Thr(Bu^t)-OH (VII). 5,267 г (5 ммоль) пептида (VI) растворяли в смеси, содержащей 200 мл диоксана, 100 мл DMF, 150 мл 1 М водного пиридин-ацетатного буфера (готовится смешиванием эквивалентных количеств пиридина и уксусной кислоты, величина рН не контролируется), 75 мл ледяной уксусной кислоты и 7,5 мл 0,2 М водного раствора CuCl₂, интенсивно перемешивали 48 ч в условиях свободного доступа воздуха,

за протеканием реакции следили методом ТСХ. По окончании реакции смесь упаривали досуха в вакууме и остаток растворяли в смеси, содержащей 500 мл CHCl_3 , 100 мл бутанола и 300 мл 1 н. HCl в воде. Водную фазу отбрасывали, органическую фазу промывали водой до нейтральной реакции и упаривали досуха в вакууме. Остаток кристаллизовали в эфире. Выход 4,15 г (86,2%).

Boc-Cys(Acm)-Ser(Bu^t)-Asn-Leu-Ser(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Cys(Acm)-Val-Leu-NHNHPh (XII). В 50 мл DMF при 0° С растворяли 4,033 г (4,18 ммоль) пептида (VII), 2,22 г (4,18 ммоль) пептида (XI), 0,564 г (4,18 ммоль) HOBT , 0,577 мл (4,18 ммоль) триэтиламина и 0,878 г DCC. Реакционную смесь перемешивали 24 ч, добавляли 210 мг DCC и перемешивали еще 48 ч. По окончании реакции в реакционную смесь добавляли 300 мл ацетона, тщательно перемешивали и оставляли на ночь при 4° С. Полученные кристаллы отфильтровывали, промывали на фильтре ацетоном и эфиром и высушивали в эксикаторе. Выход 3,82 г (63,5%). Аминокислотный анализ: Asx 1,39 (1,00), Thr 1,00 (1,00), Ser 1,96 (2,00), Val 0,82 (1,00), Leu 1,97 (2,00).

Boc-Cys(Acm)-Ser(Bu^t)-Asn-Leu-Ser(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Cys(Acm)-Val-Leu-OH (XIII). 3,6 г (2,5 ммоль) пептида (XII) растворяли в смеси, содержащей 300 мл DMF, 150 мл 1 М пиридин-ацетатного буфера, 75 мл ледяной уксусной кислоты и 7,5 мл 0,2 М водного раствора CuCl_2 . Раствор интенсивно перемешивали в условиях свободного доступа воздуха 120 ч; за протеканием реакции следили методом ТСХ. По окончании реакции реакционную смесь упаривали в вакууме и остаток кристаллизовали в водном растворе 0,1 М лимонной кислоты. Полученные кристаллы отфильтровывали, тщательно промывали на фильтре холодной водой, высушивали в эксикаторе над NaOH и перекристаллизовывали из смеси DMF-эфир. Выход 2,030 г (60%).

Z-Gly-Lys(Boc)-Leu-OH (XIV). 5,767 г (9 ммоль) пептида (XV) в смеси, содержащей 360 мл диоксана, 180 мл 1 М пиридин-ацетатного буфера, 90 мл ледяной уксусной кислоты и 9 мл 0,2 М водного раствора CuCl_2 , интенсивно перемешивали 22 ч в условиях свободного доступа воздуха; за протеканием реакции следили методом ТСХ. По окончании реакции реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в смеси 500 мл этилацетата и 300 мл 1 н. H_2SO_4 . Водную фазу отбрасывали, органическую фазу промывали водой до нейтральной реакции и упаривали в вакууме досуха. Остаток кристаллизовали в смеси этилацетата и гексана. Выход 4,963 г (100%).

Z-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser(Bu^t)-Gln-Glu(Bu^t)-Leu-NHNHPh (XX). 4,06 г (5 ммоль) пептида (XIX) гидрировали в метаноле. По окончании гидрирования катализатор отфильтровывали, реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, растворяли в 50 мл DMF и добавляли 2,753 г (5 ммоль) пептида (XVI) и 0,5 ммоль HOBT . Смесь охлаждали до 0° С в бане со льдом и добавляли 1,05 г DCC. Смесь перемешивали при постоянной температуре 24 ч. По окончании реакции в реакционную смесь добавляли 300 мл ацетона, тщательно перемешивали и оставляли на ночь при 4° С. Полученные кристаллы отфильтровывали, промывали на фильтре большим количеством эфира и высушивали в эксикаторе. Выход 5,215 г (86%). Аминокислотный анализ: Ser 0,87 (1,00), Glx 2,24 (2,00), Gly 1,00 (1,00), Leu 1,90 (2,00), Lys 0,85 (1,00).

H-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser(Bu^t)-Gln-Glu(Bu^t)-Leu-NHNHPh·HCl (XXI). 4,842 г (4 ммоль) пептида (XX) гидрировали в DMF в присутствии 4,5 мл 1 н. HCl в воде. По окончании реакции катализатор отфильтровывали, раствор упаривали в вакууме досуха и остаток кристаллизовали в эфире. Выход 4,229 г (98,1%).

Boc-Cys(Acm)-Ser(Bu^t)-Asn-Leu-Ser(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Cys(Acm)-Val-Leu-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser(Bu^t)-Gln-Glu(Bu^t)-Leu-NHNHPh (XXII). Раствор 2,025 г (1,5 ммоль) пептида (XIII), 1,616 г (1,5 ммоль) пептида (XXI), 0,207 мл (1,5 ммоль) триэтиламина и 0,203 г (1,5 ммоль) HOBT в 25 мл диметилсульфоксида охлаждали до 0° С и при перемешивании добавляли 0,39 г DCC в 25 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали при постоянной температуре 72 ч. Ход реакции контролировали методом ТСХ. По окончании реакции реакционную смесь обрабатывали

300 мл дистиллированной воды. Выпавший осадок отфильтровывали, высушивали над щелочью в вакуумном эксикаторе и перекристаллизовывали из смеси DMF — ацетон. Выход 2,41 г (67%).

Boc-Cys(Acm)-Ser(Bu^t)-Asn-Leu-Ser(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Cys(Acm)-Val-Leu-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser(Bu^t)-Gln-Glu(Bu^t)-Leu-OH (XXII). Раствор 3,166 г (1,314 ммоль) пептида (XXII) в смеси, содержащей 100 мл диметилсульфоксида, 10 мл уксусной кислоты, 20 мл 1 М водного пиридин-ацетатного буфера и 2 мл 0,2 М CuCl₂, интенсивно перемешивали 72 ч при комнатной температуре в условиях, обеспечивающих свободный доступ кислорода воздуха. По окончании реакции реакционную смесь обрабатывали 500 мл 0,1 М водного раствора лимонной кислоты. Полученные кристаллы отфильтровывали, тщательно промывали на фильтре дистиллированной водой, высушивали в вакуумном эксикаторе над щелочью и дважды перекристаллизовывали из смеси DMF — эфир. Выход 2,140 г, 0,92 ммоль (70,3%). Аминокислотный анализ: Asx 1,01 (1,00), Thr 0,68 (1,00), Ser 2,18 (3,00), Glx 2,27 (2,00), Gly 1,00 (1,00), Val 1,00 (1,00), Leu 4,28 (4,00), Lys 1,13 (1,00).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Merck Index/Ed. Budavari S. Pahway: Merck & Co., Inc. 1989. P. 249.
2. Rittel W., Brugger M., Kamber B., Riniker B., Sieber P.//Helv. chim. acta. 1968. V. 51. № 4. P. 924—928.
3. Guttman S., Pless J., Sandrin E., Jaquenoud P.-A., Bossert H., Willems H.//Helv. chim. acta. 1968. V. 51. № 5. P. 1155—1158.
4. Riniker B., Brugger M., Kamber B., Sieber P., Rittel W.//Helv. chim. acta. 1969. V. 52. № 4. P. 1058—1073.
5. Sieber P., Riniker B., Brugger B., Kamber B., Rittel W.//Helv. chim. acta. 1970. V. 53. № 8. P. 2135—2150.
6. Wunsch E., Wendlberger G., Beythien J., Hubener G.//Peptides 1990/Eds Giralt E., Andreu D. ESCOM Science Publishers B. V., 1991. P. 109—110.
7. Семенов А. Н., Ломоносова И. В., Березин В. И., Тимов М. И.//Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1074—1076.
8. Семенов А. Н., Ломоносова И. В., Тимов М. И.//Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. № 1. С. 65—74.
9. Miyazawa T., Otomatsu T., Fukui J., Yamada T., Kuwata S.//J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1988. P. 419—420.
10. Kemp D. S.//The Peptides/Eds Gross E., Meinhofer J. London: Acad. Press, 1979. V. 1. P. 317—383.
11. Сапоровская М. Б., Волкова М. М., Павлов В. А.//Журн. анализ. химии. 1989. Т. 44. № 3. С. 525—528.
12. Практическая химия белка/Ред. Дарбре А. М.: Мир, 1989. С. 280.

Поступила в редакцию
14. VII. 1992

После доработки
7. X. 1992

A. N. Semenov, I. V. Lomonosova

SYNTHESIS OF THE PARTIALLY PROTECTED FRAGMENT 1—16 OF SALMON CALCITONIN WITH THE USE OF THE PHENYLHYDRAZIDE PROTECTING GROUP

Russian-German Joint Venture «Constanta», Moscow

The partially protected fragment *Boc-Cys(Acm)-Ser(Bu^t)-Asn-Leu-Ser(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Cys(Acm)-Val-Leu-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Leu-OH* of salmon calcitonin was synthesized by the segment condensation in solution. Segments were synthesized by the DCC/HOBt method in solution with phenylhydrazide as a semipermanent protecting group for the carboxyl function of the C-terminal residue. The phenylhydrazide group was removed by oxidation with air oxygen catalyzed by copperpyridine complexes under mild conditions. The segments were then condensed by the DCC/HOBt method according to the scheme (6 + 3) + (3 + 4). The proposed scheme makes it possible to product the partially protected fragment 1—16 of salmon calcitonin on the gram scale.