



УДК 547.964.07

СИНТЕЗ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ТОЗИЛПЕПТИДОВ,
СОДЕРЖАЩИХ N-МЕТИЛАМИНОКИСЛОТЫ*Рожанова В. П., Серебряный С. Б.**Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев*

Синтезированы новые защищенные ди- и трипептиды общей формулы Tos-P₂-Arg-OMe, Tos-P₃-P₂-Arg-OMe (P₂=Gly, MeVal или Val, P₃=Gly или Sar). Остатки N-метиламинокислот вводили в пептиды с помощью N-оксисукцинимидных эфиров. В случае образования пептидной связи P₂-Arg наиболее успешной оказалась конденсация пентафторфениловых эфиров тозиламинокислот или тозилдипептидов с монохлоргидратом метилового эфира аргинина.

Ряд природных антибиотиков, например энниатины, актиномицины, этамицины и др., содержат остатки N-метиламинокислот [1]. В последнее время эти аминокислоты стали широко использоваться для модификации биологически активных пептидов. Так, были получены аналоги окситоцина и вазопрессина [2], брадикинина [3], кортикотропина [4], грамицидина S [5], элעדозина [6], пептидных ювеноидов [7] и другие пептиды, содержащие N-метилированные аминокислоты.

Для изучения особенностей строения вторичных связывающих центров тромбина и трипсина ранее мы синтезировали аргинилсодержащие дипептидные субстраты указанных ферментов [8]. Целью настоящей работы является синтез субстратов тромбина и трипсина с N-метиламинокислотами в субцентрах P₂* и P₃ для выяснения роли водородных связей в катализе этими ферментами.

В работе описан синтез дипептидов общей формулы Tos-P₂-Arg-OMe (X, P₂=MeVal; XI, P₂=Gly) и трипептидов общей формулы Tos-P₃-P₂-Arg-OMe (XII, P₃=P₂=Gly; XIII, P₃=Sar, P₂=Gly; XIV, P₃=Gly, P₂=Val; XV, P₃=Sar, P₂=Val), в состав которых входят метилвалин и саркозин (N-метилглицин).

Для правильной интерпретации данных ферментативной кинетики необходимо, чтобы пептиды, включающие N-метиламинокислоты, содержали минимальное количество соответствующей неметилированной аминокислоты. Однако известные способы получения необходимых нам тозилметиламинокислот [10, 11] не предусматривают разделения метилированных и неметилированных соединений, что делает эти простые методы непригодными в данном конкретном случае. В связи с этим требующийся для синтеза пептида (X) тозилметилвалин был получен тозилированием метилвалина, синтезированного по методу Квитта, исходя из валина [12]. Физико-химические характеристики полученного соединения совпадали с литературными данными [7].

Введение метиламинокислот в пептиды сопряжено с рядом трудностей. Так, Бенонтон и др. [13], изучая степень рацемизации при синтезе пептида Z-Ala-MeLeu-Gly-OBzl по схеме 2+1 карбодимидным, N-оксисукцинимидными методами и методом смешанных ангидридов, обнаружили, что стереохимически чистый продукт (% рацемизации <0,3%) удается получить только методом N-оксисукцинимидных эфиров. Принимая это во внимание, мы синтезировали пептид (X) конденсацией аргинина с N-оксисукцинимидным эфиром тозилметилвалина согласно методике, приведенной

Сокращения: DMF — диметилформамид, Pfr — пентафторфенил.

* Обозначения подцентров P_n субстратов сделаны в соответствии с работой [9].

в работе [3]; полученное соединение обработкой хлористым тионилом в абсолютном метаноле превращали в его эфир [8].

Метод ступенчатого синтеза пептидов со свободным С-концевым аргинином, предложенный Вировцем и др. [14], приемлемый в случае синтеза пептида (X), оказался непригодным для получения эфиров (XI) — (XIII), так как соответствующие кислоты растворимы в воде, что затрудняет их очистку. Эти соединения удалось получить конденсацией пентафторфениловых эфиров тозиламинокислот или тозилдипептида (II) с монохлоргидратом метилового эфира аргинина.

Дипептид Tos-Gly-Gly-OH синтезировали действием *n*-толуолсульфохлорида на глицилглицин в водном бикарбонате натрия, а Tos-Sar-Gly-OH получался при взаимодействии *N*-оксисукцинимидного эфира тозилсаркозина с натриевой солью глицина по аналогии с работой [15].

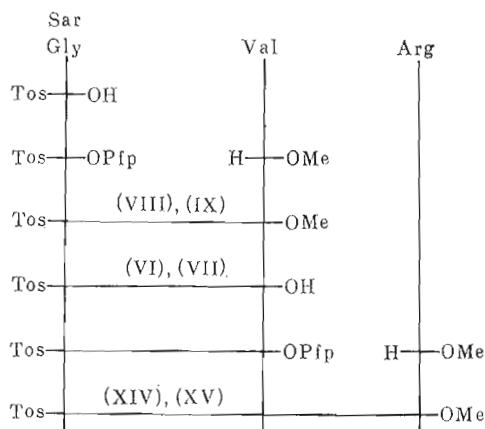


Схема синтеза пептидов (XIV) и (XV)

На схеме представлен синтез пептидов (XIV) и (XV) конденсацией пентафторфениловых эфиров соответствующих *N*-концевых дипептидов (VI) и (VII) с монохлоргидратом метилового эфира аргинина. Попытка синтеза этих соединений ступенчатым наращиванием полипептидной цепи с С-конца, исходя из ω -нитроаргинина и аргинина, оказалась неудачной. Особенности затруднения в обоих случаях обнаружались на стадии образования связи Gly-Val, где выход не превышал 10–15% при использовании карбодимидного, *N*-оксисукцинимидного и азидного методов.

Дипептид Tos-Gly-Val-OH синтезировали тремя путями: а) конденсацией *N*-оксисукцинимидного эфира тозилглицина с натриевой солью валина; б) карбодимидным методом с использованием в качестве аминокомпонента тозилата бензилового эфира валина и последующим удалением С-защитной группы каталитическим гидрогенолизом; в) конденсацией пентафторфенилового эфира тозилглицина с метиловым эфиром валина и омылением полученного продукта 0,5 *n*. NaOH в метаноле. Образцы полученного указанными способами Tos-Gly-Val-OH имели одинаковые температуры плавления, значения R_f в двух системах и удовлетворительный элементный анализ, но значительно различались по оптической активности: значения $[\alpha]_D^{25}$ пептида, полученного по методам а, б и в соответственно равны +2,0, +35,5 и +43,0 (*c* 1, EtOH). Полученные данные послужили основанием для синтеза дипептидов (VI) и (VII) по методу в.

Метиловые эфиры тозилди- и трипептидов очищали колоночной хроматографией на окиси алюминия или силикагеле; гомогенность пептидов контролировали ТСХ в двух системах и электрофорезом на бумаге при рН 3,5. Выход и характеристики полученных пептидов приведены в таблице.

Физико-химические характеристики и данные элементного анализа синтезированных соединений

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	R _f		[α] _D ²⁵	Найдено, %			Вычислено, %			
			А	В		С	Н	N	С	Н	N	
												Брутто-формула
(I) Tos-MeVal-ONSu	71	147-149	0,73	0,72	-22,0, H ₄ furan	53,84	5,88	7,43	53,34	5,80	7,33	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₆ S
(II) Tos-Sar-ONSu	73	107-108	0,62	0,80	-	49,67	4,78	8,01	49,41	4,74	8,23	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₆ S
(III) Tos-Gly-Gly-OH	53	174-175 *	0,66	0,42	-	-	-	9,69	-	-	9,78	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₆ S
(IV) Tos-Sar-Gly-OH	66	196-197	0,75	0,42	-	47,70	5,46	8,79	47,99	5,37	9,33	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₆ S
(V) Tos-MeVal-Arg-OH	73	163-165	0,26	0,61	-11,0; 1н. HCl	47,31	7,20	14,75	47,78	7,38	14,60	C ₁₉ H ₃₁ N ₃ O ₅ S·2H ₂ O
(VI) Tos-Gly-Val-OH	29	129-130	0,65	0,56	+43,0, EtOH	51,03	6,38	8,04	51,21	6,14	8,53	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₆ S
(VII) Tos-Sar-Val-OH	63	118-119	0,65	0,49	+12,1, EtOH	52,94	6,54	7,95	52,62	6,48	8,18	C ₁₅ H ₂₃ N ₂ O ₆ S
(VIII) Tos-Gly-Val-OMe	62	95-97	0,77	0,80	+6,3, EtOH	52,66	6,44	8,20	52,62	6,48	8,18	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₆ S
(IX) Tos-Sar-Val-OMe	59	71-72	0,51	0,67	+4,5, EtOH	53,70	6,93	7,75	53,92	6,79	7,86	C ₁₆ H ₂₁ N ₂ O ₆ S
(X) Tos-MeVal-Arg-OMe	97	Масло	0,18	0,48	-17,5, MeOH	48,50	7,02	14,03	48,82	6,97	14,23	C ₂₀ H ₃₃ N ₃ O ₅ S·HCl
(XI) Tos-Gly-Arg-OMe	61	»	0,32	0,53	+10,0, EtOH	47,00	6,54	15,06	47,05	6,36	15,24	C ₁₆ H ₂₂ N ₃ O ₅ S·CH ₃ COOH
(XII) Tos-Gly-Gly-Arg-OMe	43	»	0,14	0,46	-6,0, EtOH	43,72	6,36	15,42	43,29	6,52	15,53	C ₁₈ H ₂₈ N ₆ O ₆ S·HCl·1,5 CH ₃ COOH
(XIII) Tos-Sar-Gly-Arg-OMe	50	»	0,18	0,52	-2,5, EtOH	45,04	6,54	15,41	44,56	6,36	15,59	C ₁₉ H ₃₀ N ₆ O ₆ S·HCl·CH ₃ OH
(XIV) Tos-Cly-Val-Arg-OMe	62	»	0,27	0,62	-8,5, EtOH	46,87	6,77	14,91	46,59	6,93	14,82	C ₂₁ H ₃₄ N ₆ O ₆ S·HCl·CH ₃ OH
(XV) Tos-Sar-Val-Arg-OMe	45	»	0,30	0,63	-3,5, EtOH	47,93	6,78	14,93	48,12	6,79	15,31	C ₂₂ H ₃₆ N ₆ O ₆ S·HCl

* По [16] т. пл. 178-179° С.

Экспериментальная часть

В работе использовали *L*-аминокислоты фирмы «Reanal» (Венгрия). Температуры плавления определяли в открытом капилляре; они приведены без исправления. Аналитическую ТСХ проводили на пластинках «Silufol» (ЧССР) в системах *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (А), *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 30 : 20 : 6 : 10 (Б). Электрофорез осуществляли в приборе с горизонтальной охлаждаемой плитой при напряжении 80 В/см и рН 6,5 на бумаге FN-16. Пептиды обнаруживали реактивом Сакагучи.

Оптическую активность определяли на спектрополяриметре «Spectropol-1» (Sofica, Франция) в термостатированной (при 25° С) кювете с длиной оптического пути 1 см. Концентрация растворов 1%.

Метилвалин получали согласно методике [12] с выходом 40%. Т. пл. > 300° С. $[\alpha]_D^{25} +29,4$ (с 1; 6 н. HCl); лит. $[\alpha]_D^{25} +33,1$ (с 1; 6 н. HCl).

Тозиламинокислоты синтезировали по методу, приведенному в работе [8], и затем кристаллизовали из воды или водного спирта.

Тозилметилвалин. К раствору 0,3 г (2,3 ммоль) метилвалина в 3,5 мл 1н. NaOH при перемешивании добавляли эфирный раствор 0,95 г (5 ммоль) *n*-толуолсульфохлорида. Перемешивали 8 ч при рН 9–10. Избыток *n*-толуолсульфохлорида экстрагировали эфиром (3×5 мл), водный слой подкисляли 1 н. HCl до рН 2. Выделившееся масло экстрагировали эфиром, растворитель упаривали и остаток сушили в вакууме над P₂O₅. В дальнейшем использовали в виде масла.

К раствору 0,118 г (0,415 ммоль) тозилметилвалина в 2 мл эфира при 0° С добавляли 0,1 мл (0,5 ммоль) дициклогексиламмина и оставляли при 5° С. Образовавшуюся дициклогексиламмониевую соль отфильтровывали и кристаллизовали из смеси спирт — эфир. Т. пл. 160–163° С, $[\alpha]_D^{25} -21,0$ (DMF); лит. данные: т. пл. 161–164° С, $[\alpha]_D^{25} -18,6$ (с 0,47, DMF) [7].

N-Оксисукцинимидные эфиры тозиламинокислот (I, II) получали по методике, приведенной в работе [8]. Их очищали кристаллизацией из изопропилового спирта.

Тозилглицилглицин (III). К раствору 4,61 г (35 ммоль) глицилглицина и 5,6 г NaHCO₃ в 100 мл воды добавляли 10,0 г *n*-толуолсульфохлорида в 50 мл эфира и перемешивали 3 ч при 20° С. Реакционную смесь обрабатывали эфиром (3×30 мл), водный слой подкисляли HCl до рН 2. Выпавший осадок отфильтровывали и кристаллизовали из воды.

Тозилсаркозилглицин (IV). К раствору 0,22 г (2,94 ммоль) глицина в 5 мл смеси вода — DMF (1 : 1), содержащей по 2,94 ммоль NaOH и NaHCO₃, добавляли 1,0 г (2,94 ммоль) *N*-оксисукцинимидного эфира тозилсаркозина и перемешивали 2 ч при 20° С. Затем прибавляли 5 мл смеси вода — DMF (1 : 1) и оставляли на 1 сут. Растворитель упаривали досуха, остаток кипятили с 10 мл этилацетата, отфильтровывали, промывали эфиром. Аморфный бесцветный продукт растворяли в 3 мл воды и подкисляли 6 н. HCl до рН 2. Выпавший осадок отфильтровывали и кристаллизовали из воды.

Тозилметилвалиларгинин (V). К раствору 0,88 г (2,3 ммоль) *N*-оксисукцинимидного эфира тозилметилвалина в 2,5 мл диоксана добавляли раствор 0,35 г (1,9 ммоль) аргинина в 1,5 мл воды и перемешивали 24 ч. Растворитель упаривали, добавляли 3 мл DMF и оставляли на 1 сут. Затем реакционную смесь разбавляли 50 мл этилацетата и оставляли на 12 ч при 4° С. Образовавшийся осадок отфильтровывали и кристаллизовали из воды.

Пептиды (VIII), (IX). К суспензии 10 ммоль хлоргидрата метилового эфира валина в 3 мл DMF при 0° С добавляли 10 ммоль триэтиламина и оставляли при этой температуре на 10 мин. Выпавшую соль отфильтровывали, а раствор аминокомпонента прибавляли к активированному эфиру, полученному следующим способом: к раствору 10 ммоль соответствующей тозиламинокислоты в 20 мл DMF при 0° С добавляли 10 ммоль пентафторфенола и 10 ммоль *N,N'*-дициклогексилкарбодимида, в реакционную смесь

добавляли раствор метилового эфира валина и оставляли при 20° С на 1 сут. Дициклогексилмочевину удаляли фильтрованием, а растворитель упаривали. Остаток растворяли в этилацетате, последовательно промывали 1 н. HCl, насыщенным раствором NaHCO₃, 25% раствором NaCl и сушили над MgSO₄. Растворитель упаривали до малого объема и разбавляли гексаном. Осадок отфильтровывали и кристаллизовали из водного спирта.

Тозилглицилвалин (VI). К раствору 4,5 ммоль метилового эфира (VIII) в 9 мл метанола добавляли 9 мл 0,5 н. NaOH и перемешивали 4 ч при 20° С. Растворитель упаривали досуха, остаток растворяли в 3 мл воды и подкисляли 6 н. HCl до pH 2. Выделившееся масло экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу отделяли, промывали 25% NaCl до нейтральной реакции, сушили над MgSO₄ и упаривали, остаток кристаллизовали из водного спирта.

Тозилсаркозилвалин (VII) получали аналогично соединению (VI) омылением 5,6 ммоль метилового эфира (IX) в смеси 11,2 мл метанола и 11,2 мл 0,5 н. NaOH. Этилацетатный раствор полученного вещества обрабатывали насыщенным раствором NaHCO₃, содержащим NaOH, водный слой отделяли и подкисляли до pH 2. Осадок отфильтровывали и кристаллизовали из водного спирта.

Метиловый эфир тозилметилвалиларгинина (X). К 3 мл абсолютного метанола, охлажденного до -15° С, при перемешивании добавляли 0,1 мл свежеперегнанного хлористого тионила и 0,75 г (4,4 ммоль) соединения (V) небольшими порциями. Перемешивали при -15° С 10 мин, затем температуру медленно поднимали до 40° С и раствор выдерживали при этой температуре еще 3 ч. Метанол упаривали, полученное масло растворяли в абсолютном метаноле и снова упаривали. Остаток растворяли в 5 мл смеси хлористый метилен — метанол (4:1) и пропускали через колонку (25×2 см) с силикагелем L 100/250 мкм (Chemapol, ЧССР), предварительно уравновешенным с хлористым метиленом. Элюировали той же смесью. Фракции, содержащие материал, соединяли и растворитель упаривали. Продукт сушили в вакууме над P₂O₅.

Пептиды (XI) — (XV). К раствору 1 ммоль соответствующей тозиламинокислоты (или тозилдипептида) и 1 ммоль пентафторфенола в 15 мл DMF, охлажденному до 0° С, добавляли при перемешивании 1,1 ммоль N,N'-дициклогексилкарбодиимида. Через 1 ч в реакционную смесь прибавляли раствор 1 ммоль дихлоргидрата метилового эфира аргинина в 15 мл DMF, содержащий 1 ммоль триэтиламина, и оставляли при 20° С на 1 сут. Дициклогексилмочевину отфильтровывали, растворитель упаривали до небольшого объема и разбавляли 50 мл этилацетата. Выделившееся масло дважды обрабатывали горячим этилацетатом. Полученный маслообразный продукт (0,6—0,8 г) растворяли в 2 мл метанола и наносили на колонку (40×2 см), заполненную основной окисью алюминия (Reanal, Венгрия) со степенью активности II по Брокману. Элюирование проводили 200 мл метанола. Фракции, содержащие чистый пептид, соединяли, растворитель упаривали, остаток сушили в вакууме над P₂O₅. Получали пептиды (XI) — (XV) в виде бесцветных аморфных порошков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ebata M., Takahashi Y., Otsuka H. Bull. Chem. Soc. Jap., 1966, v. 39, № 11, p. 2535—2538.
2. Hlavaček J., Poduška K., Jošt K., Fric J., Barth T., Cort J., Blaha K., Šorm F. Coll. Czech. Chem. Commun., 1977, v. 42, № 4, p. 1233—1247.
3. Филарова М. П., Крив Н. А., Бесчастная Н. В., Рейссманн З. Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 10, с. 1445—1454.
4. Blake J., Li C. H. Int. J. Pept. Prot. Res., 1972, v. 4, № 5, p. 343—345.
5. Sugano H., Abe H., Miyoshi M., Kato T., Izumiya N. Bull. Chem. Soc. Jap., 1974, v. 47, № 3, p. 698—703.
6. Sugano H., Higaki K., Miyoshi M. Bull. Chem. Soc. Jap., 1973, v. 46, № 1, p. 231—237.
7. Hlavaček J., Poduška K., Šorm F., Sama K. Coll. Czech. Chem. Commun., 1976, v. 41, № 7, p. 2079—2087.
8. Кубишев В. К., Романова В. П., Серебряный С. Б. Химия природных соединений, 1978, с. 368—373.

9. *Schechter J., Berger A.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1967, v. 27, № 2, p. 157-162.
10. *Fischer E., Lipschitz W.* Ber. Dtsch. Chem., 1915, B. 48, S. 360-378.
11. *Peterson K. L., Hubele K. W., Niemann C.* Biochemistry, 1963, v. 2, № 3, p. 942-946.
12. *Quitt P., Hellerbach J., Vogler K.* Helv. chim. acta, 1963, v. 46, № 31-33, p. 327-333.
13. *McDermott J. K., Benoiton N. L.* Can. J. Chem., 1973, v. 51, № 15, p. 2562-2569.
14. *Вировец С. И., Мартынов В. Ф., Туров М. И.* Ж. общ. химии, 1968, т. 38, с. 2337.
15. *Bower J. D., Guest K. P., Morgan B. A.* J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1976, v. 1, № 23, p. 2488-2492.
16. *Гринштейн Дж., Виниц М.* В кн.: Химия аминокислот и пептидов. М.: Мвр, 1965, с. 518.

Поступила в редакцию

28.I.1982

После доработки

15.III.1982

SYNTHESIS OF TOSYLPEPTIDE METHYL ESTERS CONTAINING N-METHYLAMINO ACIDS

ROMANOVA V. P., SEREBRYANY S. B.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy
of Sciences of the Ukrainian S S R, Kiev*

With the purpose of elucidating the structural peculiarities of the thrombin secondary binding sites and the role of hydrogen bonds in the catalysis, the following compounds have been synthesized: Tos-P₂-Arg-OMe (P₂ is Gly or MeVal), and Tos-P₃-P₂-Arg-OMe (P₂ is Gly or Val, P₃ is Gly or Sar). The MeVal-containing dipeptide was prepared by reacting tosylmethylvaline N-hydroxysuccinimide ester and free arginine, followed by conversion of the product into its methyl ester. The other di- and tripeptide were obtained using either tosylamino acid or tosyldipeptide pentafluorophenyl esters and arginine methyl ester monohydrochloride. Column chromatography on alumina or silica gel was used for peptide purification.