

УДК 542.95 : 547.466

ЗАЩИТА АМИНОГРУППЫ В ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ***Буров С. В., Смирнова М. П.***

Рассмотрены наиболее широко применяемые в пептидном синтезе N-защитные группы. Приведены возможные механизмы отщепления защитных группировок в кислой и щелочной среде. Рассмотрены способы синтеза реагентов для введения некоторых защитных групп.

Библиография — 65 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1567
II. Кислотолабильные защитные группы	1567
III. Щелочнолабильные защитные группы	1574

I. ВВЕДЕНИЕ

В развитии пептидной химии можно выделить два основных направления: совершенствование методов образования пептидной связи и разработка новых, более удобных защитных группировок. Успехи, достигнутые в этой области за последнее время, позволили значительно упростить синтез и повысить его эффективность.

В настоящем обзоре рассмотрено современное состояние вопроса использования N-защитных группировок при синтезе пептидов классическим и твердофазным методами.

Несмотря на наличие таких способов деблокирования, как каталитическое гидрирование, электрохимическое восстановление, действие натрия в жидком аммиаке, облучение ультрафиолетовым светом и т. д., большинство защитных групп может быть отнесено либо к кислотно-, либо к щелочнолабильным. В дальнейшем мы будем придерживаться такого условного деления, рассматривая другие методы удаления защиты только в тех случаях, когда они представляют особый интерес. Приведено лишь краткое описание традиционно используемых защитных групп, а некоторые из них вообще не рассматриваются, поскольку их свойства неоднократно обсуждались в литературе [1—5].

II. КИСЛОТНОЛАБИЛЬНЫЕ ЗАЩИТНЫЕ ГРУППЫ

Первой кислотнолабильной защитной группой, получившей широкое практическое применение и оказавшей большое влияние на развитие пептидного синтеза, явилась предложенная в 1932 г. Бергманном и Зерласом бензилоксикарбонильная группа [6]. Простота получения и доступность бензилоксикарбонильных производных, их повышенная устойчивость к рацемизации, многообразие методов деблокирования (действием бромистого водорода в уксусной кислоте, действием натрия в жидком аммиаке, каталитическим гидрогенолизом, облучением ультрафиолетовым светом) — основные причины популярности этой защитной группы.

Сравнительно недавно были разработаны новые методы удаления бензилоксикарбонильной защитной группы, которые обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционно используемыми.

В 1977 г. автором работы [7] предложен способ гидрирования с переносом водорода, оказавшийся удобным при восстановлении нитроароматических соединений. В том же году он был применен для удаления ряда защитных группировок, включая и бензилоксикарбонильную группу в классическом пептидном синтезе [8], а в дальнейшем и в синтезе твердофазным методом [9]. Оказалось, что в этом случае удаление защитных групп происходит значительно быстрее и, кроме того, удается избежать образования побочных продуктов при деблокировании нитроаргининсодержащих пептидов.

В первоначальном варианте гидрирование с переносом водорода сводилось к кипячению в течение нескольких часов раствора защищенного производного в этаноле, в присутствии циклогексена и палладия на угле или палладиевой черни. Однако кипячение раствора пептида, само по себе нежелательное, становится особенно опасным при наличии таких защитных групп, как *трет*-бутилоксикарбонильная и *трет*-бутиловые эфиры в связи с возможностью их отщепления.

Как было показано авторами работы [10], эти трудности могут быть преодолены при использовании в качестве донора водорода циклогексана-1,4. В этом случае в присутствии палладия на угле деблокирование осуществляется при комнатной температуре за 1,5—2 ч, а применение палладиевой черни позволяет полностью удалить защитную группу за 5 мин. Метод оказался пригодным и в случае производных некоторых серусодержащих аминокислот, в частности метионина.

В 1979 г. предложен еще один вариант гидрирования с переносом водорода, который предусматривает использование в качестве донора водорода муравьиной кислоты [11]. Бензилоксикарбонильная группа удаляется действием 4,4%-ного раствора муравьиной кислоты в метаноле в присутствии палладиевой черни, в атмосфере азота, или путем пропускания раствора защищенного производного в метаноле, содержащем 4,4% муравьиной кислоты через колонку с палладиевой чернью. Причем время отщепления бензилоксикарбонильной группы в большинстве случаев не превышает 10 мин; кроме того такой способ гидрирования сильно сокращает время отщепления *O*-бензильных групп.

Таким образом, гидрирование с переносом водорода позволяет быстро и эффективно осуществлять удаление бензилоксикарбонильной группы и ряда других защитных группировок.

Не менее важную роль в пептидном синтезе играет *трет*-бутилоксикарбонильная группа, которая является родоначальником поколения кислотнотлабильных групп, отщепляемых в мягких условиях. Благодаря появлению этой группировки [12] значительно расширились возможности как классического, так и твердофазного методов синтеза пептидов.

Первоначально для введения защитной группы использовался либо метод Шнабеля [13], либо метод Швицера [14], в которых ацилирование аминокислот проводят действием соответствующего азида. В последние годы, однако, наметилась тенденция к поиску более эффективных методов и реагентов для получения защищенных производных. Здесь можно отметить применение таких систем, как *трет*-бутилоксикарбонилазид — триэтиламин [15], *трет*-бутилоксикарбонилазид — имидазол и *трет*-бутилоксикарбонилазид — 1,1,3,3-тетраметилгуанидин — 1,2,4-триазол [16]. В последнем случае метод настолько эффективен, что позволяет получать полностью защищенные производные инсулина непосредственным ацилированием природного гормона, причем выход продуктов реакции превышает 90%.

Сравнительно недавно для введения рассматриваемой защитной группы было предложено использовать ди-*трет*-бутилпиروкарбонат [17]. Применение этого реагента позволило значительно упростить способ получения и повысить доступность соответствующих производных. Как показали дальнейшие исследования, метод пригоден и в случае некоторых других защитных группировок [18].

Согласно методике, предложенной авторами работ [17, 18], получение производных аминокислот сводится к их обработке ди-*трет*-бутилпирокарбонатом в системе изопропиловый спирт — вода в присутствии триэтиламина в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакция протекает с высоким выходом (~90%) и образующиеся продукты, как правило, не нуждаются в дальнейшей очистке.

С момента появления *трет*-бутилоксикарбонильной защиты по существу начинается развитие твердофазного пептидного синтеза. Использование бензилоксикарбонильной защитной группы позволило Меррифильду провести синтез лишь коротких модельных пептидов [19] из-за протекания побочной реакции расщепления связи пептид — полимер в процессе деблокирования при кислых значениях pH. Вместе с тем в

случае *трет*-бутилоксикарбонильной защиты в условиях, обеспечивающих практически количественное удаление этой группы, степень расщепления С-концевого бензильного эфира составляет 1—2% [20]. Благодаря этому удалось осуществить ступенчатый синтез рибонуклеазы А (124 аминокислотных остатка) твердофазным методом [21].

В классическом пептидном синтезе *трет*-бутилоксикарбонильная защита α -аминогруппы аминокислот обычно используется в комбинации со следующими группировками для блокирования боковых функциональных групп аминокислот: нитро- или тозилъной групп для гуаноидиновой группы аргинина; бензилоксикарбонильной группы для ϵ -аминогруппы лизина; бензильной для имидазольного азота гистидина и сульфгидрильной группы цистеина; бензиловыми эфирами для карбоксильных групп глутаминовой и аспарагиновой кислот (и С-концевой карбоксильной группы), гидроксильных групп серина, треонина и тирозина.

Таким образом, при соответствующем выборе прочих защитных группировок *трет*-бутилоксикарбонильная группа может с успехом использоваться при синтезе пептидов самой разнообразной последовательности как классическим, так и твердофазным методами.

Тем не менее можно отметить ряд специфических трудностей, возникающих при использовании этой защитной группы. Достаточно упомянуть проблему избирательности при блокировании α - и ϵ -аминогрупп лизина [22] и *трет*-бутилирование триптофаносодержащих пептидов, происходящее при удалении *трет*-бутилоксикарбонильной группировки [23—25]. Поэтому появилась необходимость разработки N-защитных групп более кислотолабильных, чем *трет*-бутилоксикарбонильная, а также групп, которые могут быть селективно удалены в присутствии *трет*-бутилоксикарбонильной защиты и *трет*-бутиловых эфиров, используемых для блокирования боковых функциональных групп аминокислот или С-концевой карбоксильной функции.


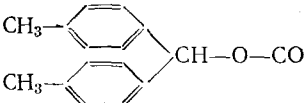
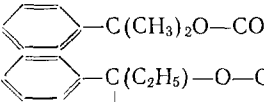
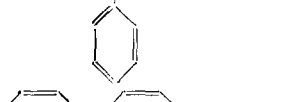
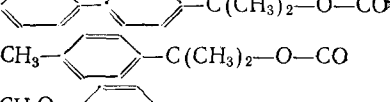
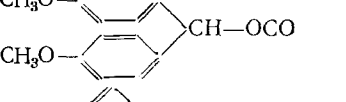
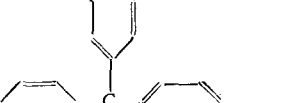
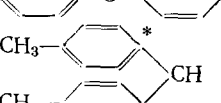
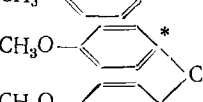
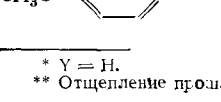
Стабильность такого рода группировок к действию кислот и механизм их отщепления были подробно исследованы в 1968 г. авторами работы [26]. На примере различных групп алкильного и уретанового типа было показано, что скорость их ацидолитического расщепления зависит от стабильности образующегося карбониевого иона и кислотности реакционной среды. При этом, скорость удаления некоторых защитных групп оказалась в 60 000 раз выше по сравнению с *трет*-бутилоксикарбонильной группой (см. табл. 1). К сожалению, большая их часть непригодна к использованию в пептидном синтезе из-за неустойчивости азидов или хлорформинатов, используемых в качестве реагентов для введения защиты. Поэтому авторы остановились на дифенилизопропилоксикарбонильной группировке [27], скорость отщепления которой в 3000 раз больше, чем *трет*-бутилоксикарбонильной. Для введения этой защитной группы было предложено использовать взаимодействие соответствующего азида или фенолкарбоната с эфирами или солями аминокислот. При проведении деблокирования оказалось возможным применение разбавленной уксусной кислоты и других слабых кислотных реагентов, что позволяет сохранить присутствующие в наращиваемой пептидной цепи другие кислотолабильные группировки, особенно *трет*-бутилоксикарбонильные и *трет*-бутиловые эфиры. При этом, благодаря большому различию в скоростях отщепления бензилоксикарбонильной и дифенилизопропилоксикарбонильной защиты может быть решена проблема избирательности для трифункциональных аминокислот.

К недостаткам рассматриваемой защитной группы наряду с труднодоступностью исходных реагентов для ее получения можно отнести и слишком высокую кислотолабильность, в связи с чем соответствующие производные аминокислот приходится хранить в виде дициклогексил-аммониевых солей. Теоретически возможно даже удаление дифенилизопропилоксикарбонильной защиты (ВРОС) в ходе реакции образования пептидной связи, под воздействием COOH-группы карбоксильного компонента [28], что может привести к удвоению вводимого аминокислотного остатка по схеме¹:

¹ КДИ — дициклогексилкарбодимид.

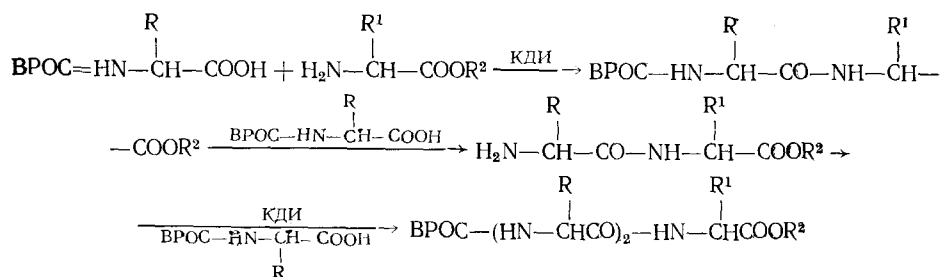
ТАБЛИЦА 1

Время 50%-ного расщепления (τ_{50}) $RHNCH_2COOY$ ($Y = C_2H_5$)
80%-ной CH_3COOH при 22—25° С [26]

R	τ_{50}
$(CH_3)_3COCO$	58 дней
	42 дня
$CH_2=CH-C(CH_3)_2-O-CO$	14 ч
	7 ч
	2 ч
	52 мин
	30 мин
	7 мин
	1 мин
	4 мин
	28 дней **
	~12 дней

* $Y = H$.

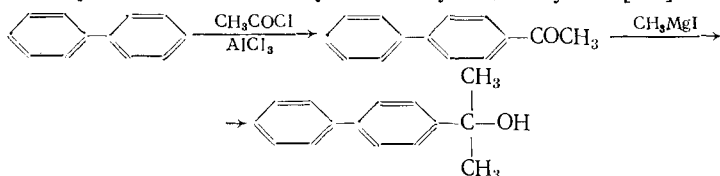
** Отщепление прошло меньше, чем на 0,1%.



Однако до сих пор таких случаев отмечено не было.

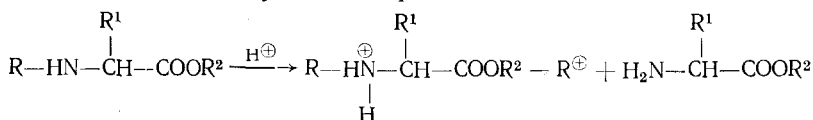
В связи с тем, что дифенилизопропилоксикарбонильная группировка представляет несомненный интерес с точки зрения использования ее в пептидном синтезе, уместно остановиться на вопросе получения исход-

ных реагентов для введения этой защиты. В частности, являющийся исходным соединением при синтезе соответствующего азида или фенилкарбоната спирт может быть получен следующим путем [29]:



Рассмотрим далее механизмы кислотно-катализируемого отщепления защитных групп алкильного и уретанового типа и вытекающие отсюда практические выводы.

В случае группировок алкильного типа расщепление под действием кислот, по-видимому, протекает по механизму, включающему протонирование азота α -аминогруппы с последующим удалением алкильного остатка в виде соответствующего карбониевого иона:



На это указывает уже тот факт, что при детритилировании пептидов действием этанольного раствора хлористого водорода в безводных условиях кроме хлоргидрата соответствующего пептида образуется тритилэтиловый эфир, а в присутствии воды — трифенилкарбинол [30].

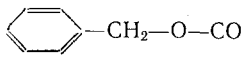
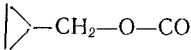
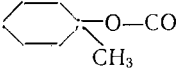
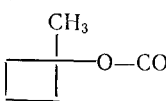
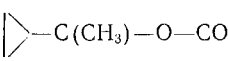
Очевидно, что в данном случае скорость отщепления защитной группировки будет определяться стабильностью образующегося карбониевого иона. Поэтому из известных групп рассматриваемого типа тритильная группа наиболее легко удаляется под действием кислот. Несмотря на это тритильная защита не нашла широкого применения в пептидном синтезе для блокирования α -аминофункции из-за создаваемых ею стерических препятствий и связанных с этим трудностей получения соответствующих производных. Но применяется для блокирования функциональных групп в боковых цепях аминокислот (в основном — меркаптогруппы цистеина).

По-видимому, существует возможность использования защитных групп с меньшим числом фенильных радикалов, содержащих в ядре электронодонорные заместители (см. табл. 1), а замена фенильного радикала на метил позволяет осуществлять стабилизацию карбкатиона путем образования олефина. Не исключено, однако, что в последнем случае может встать вопрос о стабильности и реакционной способности галогенпроизводных, используемых для введения таких группировок.

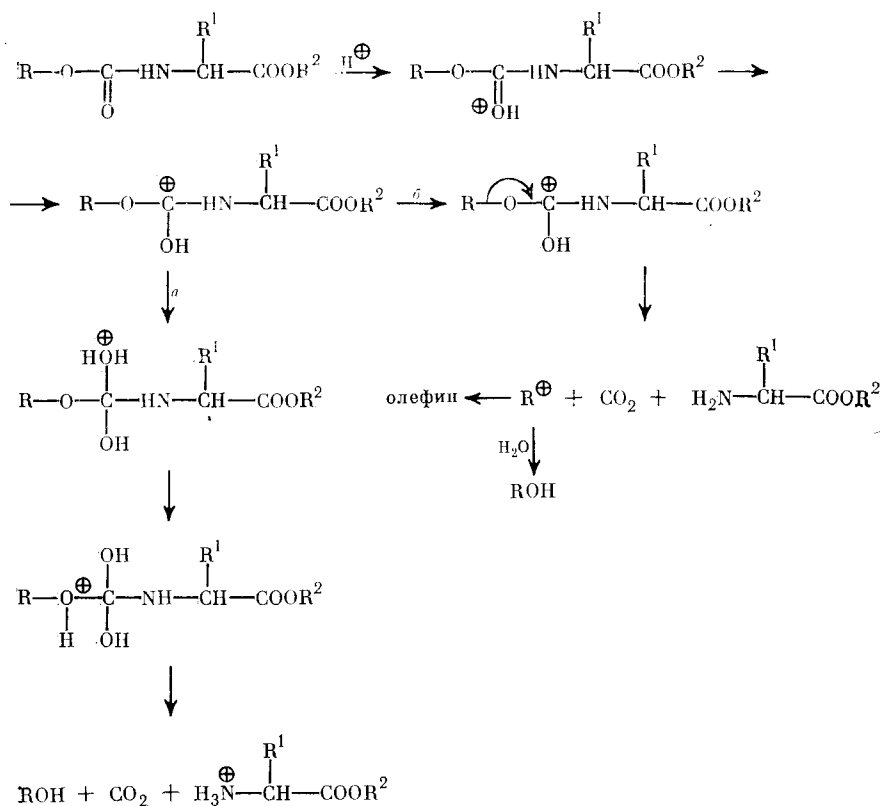
При кислотном расщеплении защитных групп уретанового типа возможны два механизма реакции [31]. Структуры, родственные бензилоксикарбонильной группе, реагируют по бимолекулярному механизму, родственные *трет*-бутилоксикарбонильной группе — по мономолекулярному:

ТАБЛИЦА 2

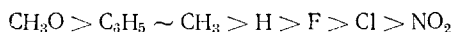
Время 50 %-ного расщепления (τ_{50}) различных N-защитных групп
в случае деблокирования производных фенилаланина [34]

Защитная группа	τ_{50} (25° С, мин)		Защитная группа	τ_{50} (25° С, мин)	
	CF ₃ COOH	HCOOH		CF ₃ COOH	HCOOH
 —CH ₂ —O—CO	300	—	(CH ₃) ₃ —C—O—CO	1*	4
 —CH ₂ —O—CO	40	—	 —O—CO	1*	2
 —O—CO	2	—	 —C(CH ₃)—O—CO	—	1,5

* Время полного отщепления.



Отсюда следует, что группировки первого типа будут удаляться с тем большей скоростью, чем выше электронная плотность в бензольном ядре. Действительно, как показали авторы статьи [32], скорость расщепления бромистым водородом в уксусной кислоте *para*-замещенных производных бензилоксикарбонильной группы изменяется следующим образом:



В случае группировок второго типа существует корреляция между скоростью отщепления защитных групп и скоростью сольволиза соответствующих тозилатов [33, 34]. Полученные данные приведены в табл. 2.

Проведенное исследование позволило авторам работы [34] предложить новую защитную группировку — 1-метилциклобутилоксикарбонильную, которая устойчива в 50%-ной уксусной кислоте и удаляется действием трифторуксусной кислоты менее чем за 30 мин. Повышенная стабильность по отношению к водной уксусной кислоте, которая обычно используется в качестве растворителя при очистке высших пептидов, дает этой группе некоторые преимущества по сравнению с *трет*-бутилоксикарбонильной защитой.

Если сопоставить данные табл. 1 и 2, то можно сделать следующие выводы: 1) скорость кислотно-катализируемого отщепления резко возрастает при переходе от бимолекулярного механизма к мономолекулярному; 2) введение заместителей, способствующих делокализации или уменьшению положительного заряда образующегося карбокатиона, приводит к увеличению скорости отщепления; 3) наличие метильной группы при атоме углерода, несущем положительный заряд, также увеличивает скорость отщепления, благодаря стабилизации карбокатиона путем образования олефина.

Следует отметить, что образование карбониевых ионов в процессе удаления защитных групп рассматриваемого типа является источником таких крайне нежелательных побочных реакций, как алкилирование

остатков метионина и триптофана [35], входящих в состав синтезируемого пептида. Например Вюнш указывает, что деблокирование фтористым водородом как в классическом, так и твердофазном синтезе благоприятствует протеканию побочных реакций с участием остатков триптофана даже в присутствии добавок веществ, снижающих побочные реакции [36]. В ряде работ также указывается, что применение добавок типа меркаптоэтанола, анизола, тионизола, 1,2-этандитиола, скатола и т. п. далеко не всегда гарантирует отсутствие побочных процессов [37—39].

Возвращаясь к рассмотрению кислотолабильных N-защитных группировок, остановимся на некоторых из них, которые не нашли широкого применения в пептидном синтезе, но благодаря тем или иным преимуществам могут оказаться весьма ценными при синтезе пептидов.

Здесь, прежде всего, можно отметить *орто*-нитрофенилсульфенильную защиту [40], которая с успехом применялась при синтезе аналогов окситоцина [41]. Соответствующие защищенные производные обычно получают с помощью *о*-нитрофенилсульфенилхлорида, хотя недавно было предложено использовать *о*-нитрофенилтиоцианат [42]. Последний более стабилен при хранении и вступает в реакцию с аминокислотами в присутствии нитрата серебра при pH 6—9, с хорошим выходом. В 1979 г. Чипенсом и сотрудниками был разработан новый метод получения *о*-нитрофенилсульфенилхлорида и *о*-нитрофенилсульфениламинокислот [43]. Оказалось, что при проведении хлорирования 2,2-динитродифенилдисульфида с помощью хлористого сульфурила в хлористом метиле при 40—45°С удается избежать образования примесей.

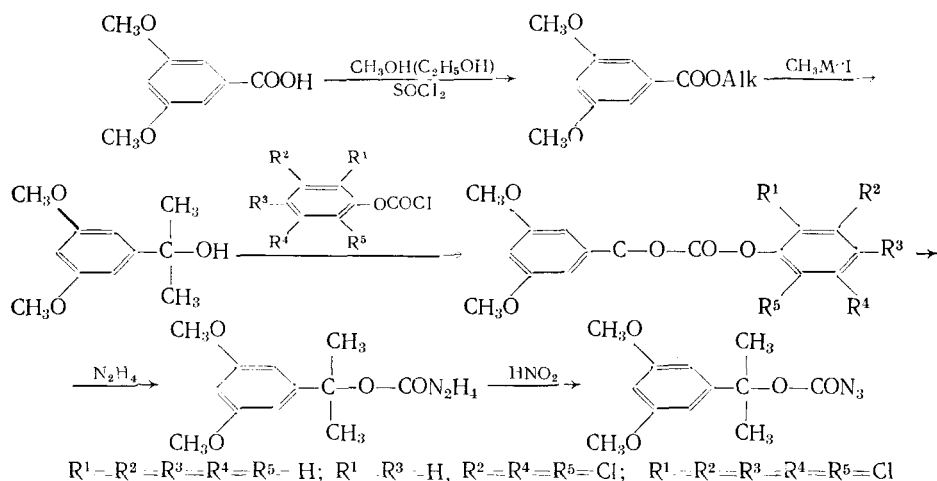
орто-Нитрофенилсульфенильная защитная группа может быть селективно удалена в присутствии *трет*-бутиловых эфиров с помощью раствора хлористого водорода в диэтиловом эфире.

Авторы работы [44] предложили использовать адамантилоксикарбонильную группировку. Введение защиты осуществляется с помощью адамантилоксикарбонилхлорформата, который может быть получен из соответствующего спирта действием избытка фосгена в бензольном растворе в присутствии пиридина. Реакция с аминокислотами протекает при охлаждении или при комнатной температуре в течение короткого времени. Защитная группа удаляется действием трифторуксусной кислоты в течение 15 мин, причем адамантан образует стабильный карбониевый ион, который может вступать в реакцию с анионом из окружающей среды, но не способен к потере протона с образованием олефина.

Авторами [44] также отмечено, что адамантилоксикарбонильные производные являются нингидрин-положительными при нагревании до 100°С. Интересен также тот факт, что адамантилоксикарбонилхлорид может быть использован в качестве конденсирующего агента при синтезе методом смешанных ангидридов, однако такой способ образования пептидной связи особой ценности не представляет.

В 1967 г. была предложена *трет*-амилоксикарбонильная защита [45]. В отличие от *трет*-бутилоксикарбонильной группы для ее введения оказалось возможным использовать соответствующий хлорформат. Реакцию проводят с эфиром аминокислоты и полученное производное омыляют или превращают в гидразид. В качестве реагента для введения защиты может применяться и *трет*-амилоксикарбонилазид или ди-*трет*-амилпирокарбонат. Рассматриваемая группировка по свойствам практически не отличается от *трет*-бутилоксикарбонильной защиты.

Авторами работы [46] была изучена возможность применения α,α -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильной защитной группы. В дальнейшем эта группировка широко использовалась при синтезе пептидов как классическим, так и твердофазным методами [47, 48]. Был разработан способ получения α,α -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил-азида и соответствующих смешанных фенолкарбонатов из 3,5-диметоксibenзойной кислоты по схеме (выходы на всех стадиях не ниже 80%):



Эти реагенты вводятся в реакцию с солями аминокислот и тритоном Б в безводном пиридине. Защитную группу можно селективно удалять в присутствии *трет*-бутилоксикарбонильной группировки и *трет*-бутиловых эфиров действием 1—5%-ной трифторуксусной кислоты в хлористом метиле в течение 8—30 мин. При этом оказалось, что скорости ацидолизического отщепления *трет*-бутилоксикарбонильной, α,α -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильной и 2-(*n*-дифенил)-изопропилоксикарбонильной группировок относятся как 1 : 1400 : 3000. Предложенная защита является также фотолабильной, что позволяет удалять ее ультрафиолетовым облучением. Защищенные производные термолабильны и дают положительную реакцию с нингидрином при нагревании до 100° С. Применение рассматриваемой группировки при синтезе методом смешанных ангидридов позволяет значительно упростить все операции и, кроме того, избежать отмечавшихся в ряде случаев побочные реакции для пролинсодержащих пептидов [49].

Из последних разработок в области применения кислотолабильных N-защитных групп можно отметить 1-(1-адамантил)-1-метилэтоксикарбонильную защиту [50]. В качестве реагента для введения этой группы применяют фенолкарбонат, который синтезируют из 1-адамантилкарбонической кислоты. Реакция с аминокислотами проводится в диметилформамиде при 50° С. Деблокирование производят действием 3%-ной трифторуксусной кислоты в хлористом метиле в течение 2—3 мин.

Другие кислотолабильные N-защитные группировки либо не нашли широкого применения в пептидном синтезе, либо представляют чисто теоретический интерес.

В заключение следует отметить, что защитные группы, отщепляемые в мягких кислотных условиях, играют важную роль в классическом и особенно в твердофазном пептидном синтезе. Применение их для защиты N-конца в синтезе полипептидов позволяет использовать для блокирования функциональных групп в боковых цепях аминокислот, не только такие сравнительно стабильные группы, как бензилоксикарбонильная, но и группировки типа *трет*-бутилоксикарбонильной и *трет*-бутиловых эфиров. Благодаря этому упрощается как выполнение операций в ходе наращивания пептидной цепи, так и проведение стадии деблокирования.

III. ЩЕЛОЧНОЛАБИЛЬНЫЕ N-ЗАЩИТНЫЕ ГРУППЫ

Следует отметить, что в настоящее время лишь несколько щелочнолабильных группировок такого рода используются в пептидном синтезе. Однако полученные результаты свидетельствуют о том, что поиск защитных групп, отщепляемых в мягких щелочных условиях, является весьма перспективным направлением развития пептидной химии. Действительно, появление таких защитных группировок позволило бы избежать трудностей, возникающих при деблокировании действием кислот метионин- и триптофансодержащих пептидов, а их применение в комбинации с кислотолабильными защитами для функциональных групп в боковых

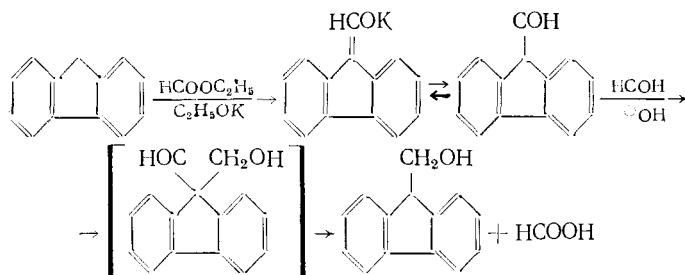
радикалах аминокислот значительно расширило бы возможности пептидного синтеза.

Первым шагом в этом направлении явилось использование трифторацетильной защиты [51]. Трифторацетиламинокислоты могут быть получены действием на аминокислоты трифторуксусного ангидрида в безводной трифторуксусной кислоте или аминолизом эфиров трифторуксусной кислоты, а для удаления защитной группы можно применять обработку водным аммиаком, едким натром, гидроокисью бария или взаимодействием с основными ионообменными смолами.

К сожалению, уже в процессе получения защищенных производных аминокислот возможен целый ряд побочных реакций, кроме того, в определенных условиях наблюдаются перегруппировки с образованием азлактонов, что приводит к рацемизации защищаемого аминокислотного остатка. Поэтому трифторацетильные производные используются в основном только в газохроматографическом анализе при установлении аминокислотной последовательности или определении степени рацемизации [52, 53].

В настоящее время в пептидном синтезе все более широкое применение находит 9-флуоренилметоксикарбонильная защита, разработанная в 1970 г. [54]. Для введения этой группировки авторы применяют соответствующий азид или хлорформинат в водном диоксане в присутствии бикарбоната или карбоната натрия.

Исходным соединением при синтезе реагентов для введения данной защитной группировки является 9-флуоренилметанол. Последний относится к сравнительно малодоступным соединениям, однако он может быть легко получен из флуорена по следующей схеме [62]:



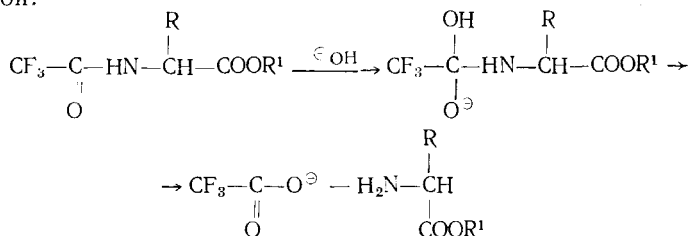
Выход конечного продукта более 67%. Промежуточно образующийся 9-формилфлуорен можно, по-видимому, не выделять в чистом виде.

Деблокирование защищенных аминокислот или пептидов производится действием жидкого аммиака, этаноламина, морфолина или сходных аминов. В последнее время было предложено использовать для этой цели пиперидин, связанный с полистиролом [55], или другие полимерные основания [56]. По данным работы [54] 9-флуоренилметоксикарбонильная группа стабильна в условиях обработки бромистым или хлористым водородом в органических растворителях, трифторуксусной кислотой, а также в условиях гидрогенолиза. Однако, как показало специальное исследование процесса гидрирования защищенных производных в метаноле в присутствии небольших количеств уксусной кислоты и 10% палладия на угле, в этом случае происходит образование побочных продуктов [57]. Установленное несоответствие данных авторы объясняют различным качеством используемого катализатора: частично отравленный катализатор может быть неактивен по отношению к рассматриваемому производному.

В классическом пептидном синтезе 9-флуоренилметоксикарбонильная защита была использована при последовательном наращивании пептидной цепи методом активированных эфиров [58], а также для блокирования α -аминофункции трифункциональных аминокислот в сочетании с *трет*-бутилоксикарбонильной группой и *трет*-бутиловыми эфирами [59] для защиты боковых функциональных группировок. При этом в отдельных случаях были отмечены побочные реакции, приводящие к удвоению вводимого аминокислотного остатка.

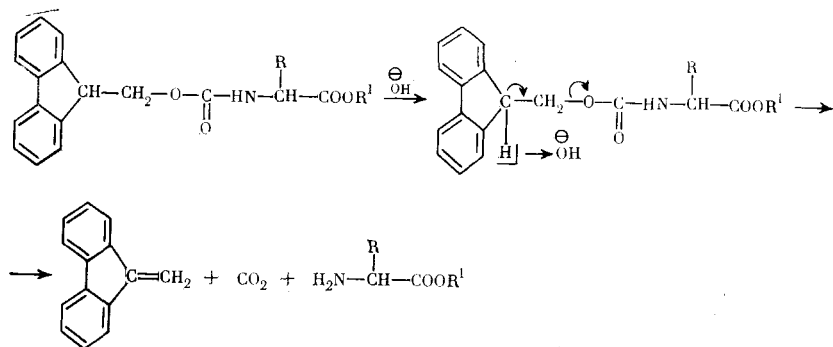
Возможности применения рассматриваемых производных в твердо-фазном пептидном синтезе были подробно изучены авторами работ [60, 61].

При изучении механизмов отщепления щелочнолабильных групп могут быть проведены некоторые формальные аналогии с механизмами отщепления кислотолабильных защитных группировок. Так, защиты, родственные трифторацетильной, удаляются в соответствии со следующей схемой:

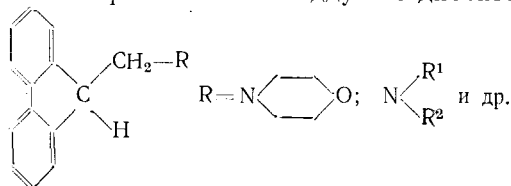


Приведенное уравнение реакции формально напоминает кислотно-катализируемое отщепление группировки алкильного типа — и в том, и другом случае защитная группа удаляется без фрагментации с образованием соответствующего иона. В рассматриваемом случае скорость реакции, очевидно, будет определяться величиной дробного положительного заряда на углеродном атоме карбонильной группы.

В настоящее время не разработано единых представлений по поводу механизма удаления 9-флуоренилметоксикарбонильной защиты. По-видимому, здесь существенна природа растворителя. В среде апротонных растворителей механизм процесса не установлен, в воде, метаноле, *трет*-бутаноле он близок к карбанионному [56]. В первом приближении отщепление 9-флуоренилметоксикарбонильной группы может быть представлено уравнением:

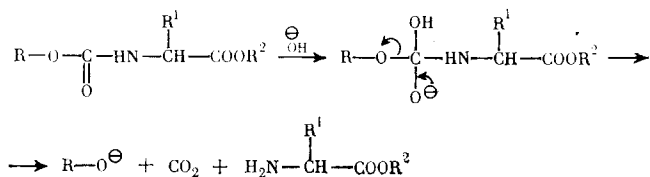


Данная реакция по своему характеру сходна с процессом удаления защитных групп типа бензилоксикарбонильной — в обоих случаях происходит фрагментация группировки, не сопровождающаяся образованием самостоятельно существующих ионов. В данном случае скорость расщепления будет определяться стабильностью промежуточно образующегося карбаниона. Для 9-флуоренилметоксикарбонильной защиты стабилизация карбаниона достигается путем β -элиминирования, приводящего к образованию дибензофульвена. При этом в зависимости от условий реакции и реагентов, используемых при деблокировании, в качестве побочного продукта может образовываться аддукт с дибензофульвеном вида:



Продолжая сопоставление механизмов отщепления кислотно- и щелочнолабильных защитных групп можно предположить существование

третьего пути удаления щелочнолабильных группировок. При этом реакция должна протекать через стадию фрагментации с образованием самостоятельно существующих ионов, как это имеет место в случае *трет*-бутилоксикарбонильной группы. Механизм этого процесса можно было бы выразить уравнением:

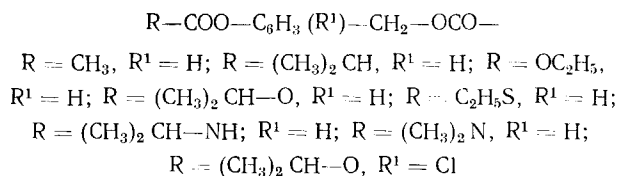


Очевидно, скорость протекания такой реакции зависит от устойчивости образующегося аниона и, следовательно, от электронных эффектов заместителя R. Косвенным подтверждением возможности существования данного механизма является тот факт, что при переходе от бензилоксикарбонильной группы к фенил-, нафтилоксикарбонильной и родственным защита, которые были бы более склонны к образованию анионов при фрагментации, наблюдается повышение устойчивости к действию бромистого водорода в уксусной кислоте. Отщепление под действием этого реагента может быть проведено только в жестких условиях, приводящих к разрыву пептидных связей [63]. По-видимому, введение в бензольное ядро заместителей, способствующих стабилизации образующегося аниона, позволило бы получить щелочнолабильные защитные группировки рассматриваемого типа. В настоящее время такие N-защитные группы в пептидном синтезе не используются.

В последние годы опубликован ряд работ, посвященных поиску новых щелочнолабильных защитных групп и расширению области применения уже существующих. Еще в 1970 г. автором работы [54] было указано на возможность модификации 9-флуоренилметоксикарбонильной группировки с целью увеличения или уменьшения ее чувствительности к основаниям.

В 1978 г. Меррифильд предложил использовать 9-(2-сульфо)-флуоренилметоксикарбонильную защиту при очистке пептидов, синтезированных твердофазным методом, от побочных продуктов с укороченной аминокислотной последовательностью [64]. К аминогруппе пептидил-полимера присоединяют 9-(2-сульфо)-флуоренилметоксикарбонильную группировку, полученное производное и другие продукты отщепления подвергают разделению на диэтиламиноэтил-целлюлозе и деблокируют. Для введения защитной группы используют соответствующий хлорформат или *n*-нитрофениловый эфир аминокислоты. Деблокирование производят действием водного морфолина или пиперидина.

Недавно была исследована возможность использования *n*-замещенной бензилоксикарбонильной группы в качестве щелочнолабильной защиты [65]:



Было показано, что группировки такого вида являются более стабильными в трифторуксусной кислоте по сравнению с бензилоксикарбонильной защитой и могут быть селективно удалены в присутствии последней и *трет*-бутилоксикарбонильной групп действием H_2O_2 в аммиаке.

Таким образом, несмотря на то, что применение щелочнолабильных N-защитных групп в пептидном синтезе пока еще довольно ограничено, полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что это направление окажет существенное влияние на его развитие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринштейн Д., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965.
2. Шредер Э., Любке К. Пептиды. М.: Мир, 1967.
3. Буассона Р. В кн.: Успехи органической химии, т. 3, М.: Мир, 1966, с. 158.
4. Мак Олми Дж. Защитные группы в органической химии. М.: Мир, 1976.
5. Hardy P. M. Chem. and Ind., 1979, p. 617.
6. Bergmann M., Zervas L. Ber., 1932, B. 65, S. 1192.
7. Jackson A. E., Jonstone R. A. W. Synthesis, 1976, p. 685.
8. Gattadchattli A., Kadlebal S. M. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 1977, p. 490.
9. Shabbir K. A., Sivanandaiah K. M. Synthesis, 1978, p. 750.
10. Felix A. M., Heimer E. P., Lambros T. J., et al. J. Org. Chem., 1978, v. 43, p. 4194.
11. Babiker E. A., Gattadahalli M., Royer G. P., Means G. E. Ibid., 1979, v. 44, p. 3442.
12. McKay F. C., Albertson N. F. J. Am. Chem. Soc., 1957, v. 79, p. 4686.
13. Schanabel E. Ann. Chem., 1967, B. 702, S. 188.
14. Schwyzer R., Sieber P., Kappeler H. Helv. Chim. Acta, 1959, v. 42, p. 2622.
15. Shabbir K. A., Sivanandaiah K. M. Indian J. Chem., 1977, p. 80.
16. Keglevic D., Vuksan S., Mulac B., et al. Croat. Chem. Acta, 1978, v. 51, p. 167.
17. Позднеев В. Ф. Химия природн. соедин., 1979, с. 543.
18. Позднеев В. Ф. Биоорган. химия, 1978, т. 4, с. 1273.
19. Merrifield R. B. J. Am. Chem. Soc., 1963, v. 85, p. 2149.
20. Merrifield R. B. Endeavour, 1965, v. 23, p. 3.
21. Gutte B., Merrifield R. B. J. Am. Chem. Soc., 1969, v. 91, p. 501.
22. Bodanszky M., Ondetti M. A. Peptide Synthesis. New York: Intersci., 1966.
23. Wunsch E., Jueger E., Kisfaludy L., Low M. Angew. Chem., 1977, v. 89, p. 330.
24. Low M., Kisfaludy L., Sohar P. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1978, v. 359, p. 1643.
25. Hiroshi O., Takashi S., Hiroshi I., Haruaki Y. Chem. Pharm. Bull., 1978, v. 26, p. 3144.
26. Sieber P., Iselin B. Helv. Chim. Acta, 1968, v. 51, p. 644.
27. Sieber P., Iselin B. Ibid., 1968, v. 51, p. 622.
28. Катсоянис П. В кн.: Химия полипептидов. М.: Мир, 1977, с. 378.
29. Gull H. C., Turner E. E. J. Chem. Soc., 1929, v. 1, p. 498.
30. Zervas L., Theodoropoulos D. M. J. Am. Chem. Soc., 1956, v. 78, p. 1359.
31. Hirschman R. Intra-Sci. Chem. Rep., 1971, v. 5, p. 203.
32. Blaha K., Rudinger J. Coll. Czech. Chem. Commun., 1965, v. 30, p. 585.
33. Blaha K., Rudinger J. Ibid., 1965, v. 30, p. 599.
34. Veber D. G., Brady S. F., Hirschmann R. Proc. III Amer. Peptide Symp. Ann Arbor: Ann Arbor Sci. Publ., 1972.
35. Lundt B. F., Johansen N. L., et al. Int. J. Peptide Protein Res., 1978, v. 12, p. 258.
36. Wunsch E. In: Gut Hormones. Edinburg, London and New York: Churchill Livingstone, 1978, p. 28.
37. Кишфалуди Л., Лоу М., Шон И., Сайго М. Тезисы IV Всесоюз. симп. по химии белков и пептидов. Минск, 1977, с. 54.
38. Low M., Kisfaludy L. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1979, v. 360, p. 13.
39. Alakhov Yu. B., Kiryushkin A. A., et al. J. Org. Chem., 1970, v. 35, p. 3291.
40. Goerdeler J., Holst A. Angew. Chem., 1959, v. 71, p. 775.
41. Hlavacek J., Burlin T., et al. Coll. Czech. Chem. Commun., 1979, v. 44, p. 275.
42. Savrda J., Veyrat D. H. J. Chem. Soc., C, 1970, p. 2180.
43. Вегнер Р. Э., Полевая Л. К., Восекална И. А., Гринштейне И. В., Чипенс Г. И. Изв. АН Латв.ССР. сер. хим., 1979, с. 103.
44. Haas W. L., Krumkains E. V., Gerzon K. J. Am. Chem. Soc., 1966, v. 88, p. 1988.
45. Ян. патент 1447532 (1967); С. А., 1968, v. 68, 30064.
46. Birr C., Lochinger W., Stahnke G., Lang P. Ann. Chem., 1972, v. 163, p. 162.
47. Birr C., Nassal M., Piprorn R. Int. J. Peptide Protein Res., 1979, v. 13, p. 287.
48. Birr C. In: Peptides 1972. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1973, p. 72.
49. Beyerman H. C., Rammeloo T., Reniri I., Syrier I., Van Zoon A. Rec. I. Royal Netherlands Chem. Soc., 1976, v. 95, p. 143.
50. Kalbacher H., Voelter W. Angew. Chem., 1978, v. 90, p. 998.
51. Weygand F., Csendes E. Ibid., 1952, v. 64, p. 136.
52. Дэвени Т., Гергей Я. В кн.: Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976, с. 294.
53. Weygand F., Prox A., Schmidhammer L., Konig W. Z. Naturforsch., 1963, B. 18, S. 93.
54. Carpino L. A., Han G. Y. J. Am. Chem. Soc., 1970, v. 92, p. 5748.
55. Carpino L. A., Williams I. R., Lopusinski A. Chem. Commun., 1978, p. 450.
56. Arshady R., Atherton E., Sheppard R. C. Tetrahedron Letters, 1979, p. 1521.
57. Martinez J., Tolle J. C., Bodanszky M. J. Org. Chem., 1979, v. 44, p. 3596.
58. Bodanszky A., Bodanszky M., Chandramouli N., et al. Ibid., 1980, v. 45, p. 72.
59. Chang C.-D., Waki M., Ahmad M., Meienhofer J., et al. Int. J. Peptide Protein Res., 1980, v. 15, p. 59.
60. Atherton E., Fox H., Harkiss D., Logan C. J., et al. J. Chem. Commun., 1978, p. 537.
61. Atherton E., Fox H., Harkiss D., Sheppard R. C. Ibid., 1978, p. 539.
62. Мэррей А., Уильямс Д. Л. В кн.: Синтезы органических соединений с изотопами углерода. Ч. II. М.: ИЛ, 1962, с. 32.
63. Boissonnas R. A., Preitner G. Helv. Chim. Acta, 1953, B. 36, S. 875.
64. Merrifield R. B., Bach A. E. J. Org. Chem., 1978, v. 43, p. 4808.
65. Le Corre G., Guibe-Jampel E., Wakselman M. Tetrahedron, 1978, v. 34, p. 3105.

Ленинградский государственный
университет