

УДК 577.122.5

© 1991 г.

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ  
ИМИНОКИСЛОТЫ*Ряховский В. В., Агафонов С. В., Косырев Ю. М.*

Рассмотрены особенности реакции конденсации по иминокислотным остаткам при использовании различных методов активации карбокси-компонента. Обсуждены вопросы, связанные с рацемизацией и побочными реакциями при синтезе пептидов, содержащих иминокислоты.

Библиография — 90 ссылок.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	1817
II. Методы ацилирования иминокислот и их производных . . . . .	1818
III. Побочные реакции, обусловленные наличием иминокислот в пептидах . . .	1824
IV. Рацемизация иминокислот в пептидном синтезе . . . . .	1829

## I. ВВЕДЕНИЕ

В настоящем обзоре под термином иминокислота понимается Rго и N-замещенные аминокислоты, в которых заместителем являются (в подавляющем большинстве случаев метильный) радикалы<sup>1</sup>.

До недавнего времени использование иминокислот в пептидной химии носило эпизодический характер и ограничивалось преимущественно Rго, иминогруппа которого наименее экранирована. Однако по мере расширения внимания к этой области химии, в реакцию конденсации стали вовлекаться и иные иминокислоты, а имеющийся сейчас экспериментальный материал позволяет сделать некоторые обобщенные заключения об основных особенностях и своеобразии использования иминокислот в синтезе пептидов.

При рассмотрении особенностей конденсаций по остаткам иминокислот следует выделить реакции ацилирования вторичной аминогруппы иминокислот и их производных, так как конденсации, в которых иминокислоты выступают в качестве карбоксикомпонента, практически не отличаются от таковых с участием обычных аминокислот. В этой связи приведены лишь наиболее общие особенности, характеризующие последний вариант.

Так, наличие в иминокислотных карбоксикомпонентах объемных боковых радикалов приводит к снижению скорости конденсации [2]. Алкильный заместитель у атома азота иминокислоты создает дополнительные стерические затруднения образованию пептидной связи, но этот эф-

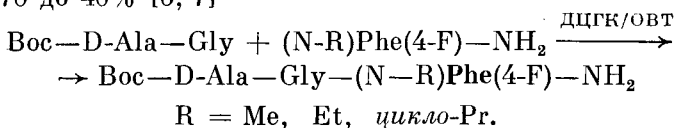
<sup>1</sup> В работе использованы сокращения, рекомендованные комиссией IUPAC — IUB [1], а также следующие аббревиатуры: Abu —  $\alpha$ -аминомасляная кислота, Aib —  $\alpha$ -аминоизомасляная кислота, BOP — бензотриазолилокси-трис-(диметиламино)фосфоний гексафторфосфат, BOP-Cl — N,N-бис-(2-оксо-3-оксозолидинил)хлорфосфат, трет-Bu — трет-бутил, Lac — молочная кислота, (N-Me)Bmt — (4R)-4[(E)-2-бутенил]-4,N-диметил-L-треонин, OBT — N-оксибензотриазол, OSu — N-оксисукцинимид, Piv-Cl — пивалоилхлорид, SPip — тиопишеколиновая кислота, ДКП — дикетопиперазин, ДЦГК — дициклогексилкарбодиймид, ТГФ — тетрагидрофуран.

фekt менее значителен по сравнению с влиянием боковых радикалов. Так, в наиболее распространенных случаях активации, наличие заместителей у атома азота в N-метиламинокислотах и Rго практически не влияет на выход продукта [3].

Наличие той или иной защитной группировки у N-алкиламиногруппы карбоксикомпонента начинает оказывать существенное влияние на реакционную способность карбоксильной группы лишь в случаях стерически наиболее затрудненных конденсаций, причем лучшие выходы достигаются при использовании Z- и Fmoc- по сравнению с Boc-защитой аминокислоты [4].

## II. МЕТОДЫ АЦИЛИРОВАНИЯ ИМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Несмотря на повышенную нуклеофильность иминогруппы (pK которой на 1—1,5 единицы выше, чем у аминокислоты [5]), что должно способствовать ацилированию, продолжительность конденсации в обсуждаемых случаях резко увеличивается, а выходы пептидов снижаются. Этот факт объясняется экранированием нуклеофильного центра, которое проявляется в наименьшей степени в случае Rго и возрастает с увеличением объема N-алкильного заместителя. Например, в синтезе трипептидных фрагментов аналога энкефалина при увеличении объема радикала R выходы снижаются от 70 до 40% [6, 7]

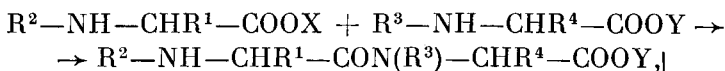


Способность аминокислот подвергаться ацилированию также снижается с увеличением у них объема бокового радикала и наличием разветвлений у  $\alpha$ - и  $\beta$ -атомов углерода [5]. Таким образом, при ацилировании иминокислотных остатков главную роль играют стерические факторы, что необходимо учитывать при выборе варианта реакции конденсации.

До недавнего времени специальные методы ацилирования остатков аминокислот не были разработаны и для этого использовались традиционные ацилирующие реагенты: активированные эфиры, симметричные или смешанные ангидриды аминокислот. Для активации карбоксикомпонента использовался также карбодиимидный метод.

### 1. Метод активированных эфиров

Для осуществления нуклеофильной атаки карбонильного атома углерода карбоксикомпонента аминокислотой, карбоксильная группа должна быть хорошо активирована



где  $\text{R}^1$  — боковой радикал карбоксикомпонента, Y,  $\text{R}^2$  — защитные группировки,  $\text{R}^3$  — алкил,  $\text{R}^4$  — боковой радикал аминокислотного компонента, X — электроноакцепторная группа.

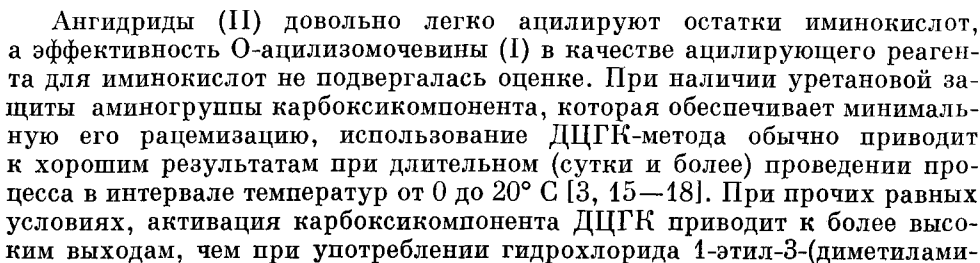
Пентафторфениловые эфиры довольно успешно используются для ацилирования аминокислот, особенно Rго [8, 9]. При этом, если конденсация ведется по наименее стерически экранированным остаткам Rго или (N-Me)Ala, то для полного завершения реакции требуется от 1 ч до 1 сут, в то время как при конденсациях этим методом по первичной аминокислоте продолжительность реакции составляет от 5 до 30 мин и сравнима с продолжительностью ацилирования ангидридами.

2,4,5-Трихлорфениловые эфиры аминокислот удовлетворительно ацилируют остатки (N-Me)Ala и Pro при катализе ОВТ [9, 10]. Не исключено, что в данном случае истинными ацилирующими реагентами являются ОВТ-эфиры.

$$\text{Boc-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH}_2 \\ \diagdown \end{array} \text{CH-COON} \begin{array}{c} \diagup \text{CO} \\ \diagdown \text{CO} \end{array} + \text{HN} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH}_2 \\ \diagdown \end{array} \text{CH-COOH} \longrightarrow$$
  

$$\longrightarrow \text{Boc-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH}_2 \\ \diagdown \end{array} \text{CH-COONH-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH}_2 \\ \diagdown \end{array} \text{CH-COOH}.$$

В середине 50-х г. в практику пептидного синтеза был введен ДЦГК [14]. При взаимодействии эквимольных количеств ДЦГК и активируемой аминокислоты с уретановой защитой образуется смесь О-ацилизомаочевины (I) и симметричного ангидрида (II)



но)пропилкарбодиимида [19]. При активации ДЦГК-методом фрагментов, не содержащих С-концевого Pro, или N-ациламинокислот без уретановой защиты, в качестве ацилирующего агента может выступать также оксазолон (III), эффективность которого по отношению к иминокислотам также не ясна [11].

В последнее время, из-за многочисленных побочных реакций и рацемизации при фрагментных конденсациях, активацию карбоксикомпонента чаще проводят ДЦГК в присутствии OBT или OSu, которые позволяют подавить образование N-ацилмочевины и свести к минимуму рацемизацию аминокислотного остатка. Продолжительность ацилирования при этом не изменяется [20]. В литературе описано много примеров использования ДЦГК/OBT-метода для ацилирования иминокислот с удовлетворительными и хорошими выходами [6, 7, 9, 13, 21]. Однако для реакций Piv—Pro с (N-Me)Phe—OMe и Boc-D-Ala—(N-Me)Leu—(N-Me)Leu с (N-Me)Val—OBzl метод ДЦГК/OBT не приводит к образованию нужного продукта, причем в последнем случае реакция не идет даже в кипящем ТГФ [2, 22].

Для ацилирования остатков иминокислот ДЦГК/OSu-метод используется не так часто как метод ДЦГК/OBT, но есть примеры достаточно успешного его применения. Так, в реакции Boc—Ala с (N-Me)Leu—OBzl при использовании ДЦГК/OSu-метода выход составил 96%, а при взаимодействии Z—Pro с Sar—(N-Me)Val—OBu-*mpem*—82% [3, 23]. С другой стороны, в конденсации Z—Val с (N-Me)Leu—OBu-*mpem* выход составил 10%, а при использовании предварительно полученного Z—Val—OSu — всего 2%. При этом в аналогичных условиях ДЦГК/OBT-метод дал выход 50% [13]. Однако имеются многочисленные данные по ацилированию этим методом наименее стерически затрудненного остатка Pro, когда при 20° С и продолжительности реакции 20—48 ч выходы составляют от 60 до 80% [24—26]. Неудачным оказалось использование ДЦГК/OSu-метода для реакции Z—Arg(Z<sub>2</sub>)—Arg(Adoc<sub>2</sub>) с Pro—Pro—Lys(Boc)—Gly [27]. Указывается также, что ДЦГК/OBT-метод дает меньше побочных продуктов, чем метод ДЦГК/OSu [21].

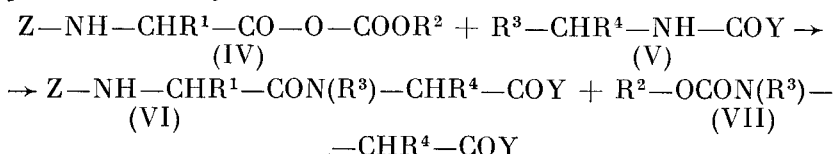
### 3. Метод симметричных ангидридов

Этот метод является вариантом ДЦГК-метода, когда в реакцию с ДЦГК вовлекается двойной избыток карбоксикомпонента. При этом первоначально образовавшаяся О-ацилизомочевина (I), взаимодействуя с избытком карбоксикомпонента, превращается в симметричный ангидрид (II). В настоящее время метод симметричных ангидридов является наиболее используемым в твердофазном синтезе и часто дает хорошие результаты при получении пептидов, содержащих иминокислоты. Так, этим путем с выходом 60% был получен аналог вещества Р, содержащий (N-Me)Phe и Sar [28]. Однако в этом случае однократное ацилирование остатка иминокислоты требует не менее 16 ч реакционного времени, вместо 30 мин — 1 ч в обычном варианте [5, 28]. Повышение температуры процесса способствует увеличению скорости реакции и выхода желаемого продукта. Так, при нагревании ангидрида Boc—Pro с D-(N-Me)Leu—OMe до 130° С в течение 5 мин получен дипептид с выходом 97%. По данным спектроскопии ЯМР продукт содержит примесь эписмера [19].

Серьезным ограничением карбодиимидного метода является невозможность получения ангидридов из пептидных фрагментов и аминокислот без уретановой защиты, хотя они образуются из любых N-ацилзамещенных производных Pro и, возможно, других иминокислот [11]. Метод симметричных ангидридов дает также всю гамму побочных продуктов, связанных с использованием ДЦГК в пептидной химии.

#### 4. Метод смешанных ангидридов с алкилугольными кислотами

Из традиционных методов образования пептидной связи для ацилирования иминокислот наиболее часто использовался метод смешанных ангидридов с алкилугольными кислотами [20]



Однако несмотря на высокую реакционную способность ангидридов (IV), выход пептида (VI) зачастую ниже, чем при использовании карбодимидного метода. Основной причиной этому служит наличие у карбокси-компонента (IV) двух реакционных центров и обусловленная этим неоднозначность реакции. Преимущественное направление атаки зависит от природы заместителей  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  и  $\text{R}^3$ . Так, наличие радикалов  $\text{R}^1$  и  $\text{R}^3$  затрудняет образование пептида (VI) тем сильнее, чем больше их молярный объем и степень разветвления [29, 30]. В ряде случаев метод смешанных ангидридов вообще не пригоден. Например, в реакциях  $\text{Boc}-D\text{-Ala}-(\text{N-Me})\text{Leu}-(\text{N-Me})\text{Leu}$  с  $(\text{N-Me})\text{Val}-\text{OBzl}$  ( $-20^\circ \text{C}$ , 26 ч) [22];  $\text{Boc}-\text{Phe}$  с фрагментом, содержащим N-концевой  $(\text{N-Me})\text{Ala}$  [9];  $\text{Boc}-\text{Ile}$  с  $\text{Pro}-\text{Leu}-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Arg}(\text{NO}_2)-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{OMe}$  [31] — он не приводит к образованию желаемых продуктов.

Разветвленный радикал  $\text{R}^2$  повышает электронную плотность на карбонильном атоме углерода остатка алкилугольной кислоты и в какой-то мере экранирует его, чем уменьшает возможность атаки последнего иминогруппой. Ацилирование иминокислот с использованием смешанных ангидридов изобутилугольной кислоты (IV),  $\text{R}^2 = \text{изо-Bu}$ , является более предпочтительным по сравнению с употреблением ангидридов этилугольной кислоты (IV),  $\text{R}^2 = \text{Et}$  [20]. Так, при ацилировании трипептида, содержащего N-концевой остаток  $\text{Pro}$ , смешанным ангидридом этилугольной кислоты с выходом 61% получен уретан  $\text{EtOC(O)}-\text{Pro}-\text{Lys}(\text{For})-\text{Asp}$  [32]. Использование ангидридов изобутилугольной кислоты также сопровождается образованием уретанов (VII) [33–35], причем их выход зависит от выбора растворителя, в котором проводится конденсация, а также от типа используемого основания. Так, для реакции  $\text{Z}-\text{Gly}-\text{Phe}$  с  $\text{Pro}-\text{OMe}$  выход уретана повышается от 13 до 33% в ряду: ТГФ, хлороформ, ДМФА [36]. Минимальное количество уретана образуется при использовании для получения ангидридов (IV) N-метилморфолина или N-метилпиперидина [37].

На выход продукта значительное влияние оказывает и молекулярная масса как имино-, так и карбоксикомпонента [20]. Например, выходы при фрагментных конденсациях  $\text{Boc}-D\text{-Ala}-\text{Gly}$  и  $\text{Boc}-\text{Tyr}-D\text{-Ala}-\text{Gly}$  с  $(\text{N-Me})\text{Phe}-\text{Met-ol}$  составили 70 и 50% соответственно [38].

Несмотря на относительную стабильность чистых смешанных ангидридов (IV) при температурах до  $25^\circ \text{C}$ , они в присутствии даже следов основания, которым может служить и сам аминокислотный компонент (V), диспропорционируют с образованием симметричных ангидридов [22, 39]. Для подавления этого процесса конденсации проводят при  $-20 : -15^\circ \text{C}$ , однако для повышения выхода, реакцию желательно проводить при более высокой температуре.

Из всех перечисленных выше реагентов, симметричные ангидриды являются наиболее приемлемыми для ацилирования иминокислот, но в самых стерически затрудненных конденсациях типа  $\text{Boc}-(\text{N-Me})\text{Val}$  с  $(\text{N-Me})\text{Val}-\text{OBu-трет}$ , даже они не эффективны [2].

## 5. Метод смешанных ангидридов с пивалиновой кислотой и кислотами фосфора

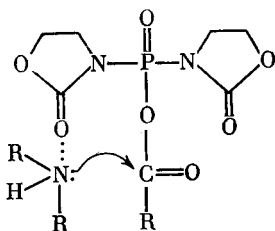
К настоящему времени наиболее известными и широко применяемыми реагентами для ацилирования иминокислот являются смешанные ангидриды, полученные на основе  $\text{Piv-Cl}$  и  $\text{BOP-Cl}$ , которые, в частности, были с успехом использованы в синтезе циклического ундекапептида Циклоспорин А и его аналогов, в составе которых содержится семь иминокислот [22, 40–42].

С 1962 г. в пептидной химии начал использоваться  $\text{Piv-Cl}$  [43]. Однако в обычных конденсациях метод смешанных ангидридов с пивалиновой кислотой не получил широкого распространения, по-видимому из-за возможности образования N-пивалоилпептидов [20]. Например, в реакции ацетонида  $(\text{N-Me})\text{Bmt}$  с  $\text{Abu-Sar-(N-Me)Leu-Val-(N-Me)Leu-Ala-OBzl}$ , получена смесь гептапептида и N-пивалоилгексапептида в соотношении 1 : 1 [42]. Однако позднее было показано, что при ацилировании иминокислот смешанными ангидридами пивалиновой кислоты не происходит образования N-пивалоилпептидов [22]. Другими достоинствами этого метода являются высокая ацилирующая способность такого ангидрида и его термическая устойчивость до  $50^\circ\text{C}$  даже в присутствии триэтиламина и N-метилморфолина, что позволяет осуществлять самые стерически затрудненные конденсации [2, 22].

К недостаткам этого метода ряд авторов [2, 44] относит значительную продолжительность стадии образования смешанного ангидрида пивалиновой кислоты, которую проводят в хлороформе. При этом отмечается, что выход целевого пептида сильно зависит от продолжительности активации. Так, для реакции  $\text{Boc-D-Ala-(N-Me)Leu-(N-Me)Leu-(N-Me)-Val-OBzl}$  выход тетрапептида составляет 60% при активации карбоксикомпонента  $\text{Piv-Cl}$  в течение 2 ч и 88% — для 4 ч [22]. Однако при проведении активации в ТГФ образование смешанного ангидрида пивалиновой кислоты завершается через 5–20 мин при  $-20^\circ\text{C}$  [13, 45, 46].

Активация иминокислот с уретановой защитой с помощью  $\text{Piv-Cl}$  не сопровождается рацемизацией даже при повышенной температуре. Только в случае чрезвычайно стерически затрудненной конденсации  $\text{Z-(N-Me)Val}$  с  $(\text{N-Me)Val-OBu-}t\text{рет}$  в течение 24 ч при  $50^\circ\text{C}$  в дипептиде было обнаружено 6% эписмера [2]. Фрагментные конденсации с использованием  $\text{Piv-Cl}$  сопровождаются рацемизацией, степень которой зависит от большого числа факторов [2, 22, 40].

В 1980 г.  $\text{BOP-Cl}$  был предложен как реагент для синтеза эфиров и других производных карбоновых кислот [47]. Впервые его высокая эффективность при образовании пептидных связей по остаткам иминокислот была показана в 1985 г. [4]. Для объяснения этого эффекта предложена схема электрофильного катализа на стадии конденсации [2]



Отмечается, что при проведении стерически очень затрудненных конденсаций  $\text{BOP-Cl}$  является более эффективным реагентом по сравнению с  $\text{Piv-Cl}$  [2, 4]. Так, в реакции смешанного ангидрида  $\text{Z-(N-Me)Val}$  и пивалиновой кислоты с  $(\text{N-Me)Val-OBu-}t\text{рет}$  положительный резуль-

тат достигается только при повышенной температуре, тогда как  $\text{BOP}-\text{Cl}$  в этой конденсации позволяет получить продукт с выходом 92% за 48 ч при 20° С [2]. По мере уменьшения стерических ограничений различия в выходах продукта при использовании  $\text{BOP}-\text{Cl}$  или  $\text{Piv}-\text{Cl}$  уменьшаются. Так, в реакции  $\text{Z}-\text{Pro}-(\text{N-Me})\text{Phe}$  с  $(\text{N-Me})\text{Ala}-\text{OBu}-t\text{mpet}$  оба реагента приводят к образованию трипептида с выходом 85%, причем в данной конденсации в случае  $\text{Piv}-\text{Cl}$  рацемизация составляет 38%, тогда как при употреблении  $\text{BOP}-\text{Cl}$  — 64% [2]. В других примерах это соотношение меняется. Обычно использование  $\text{BOP}-\text{Cl}$  сопровождается меньшей, по сравнению с  $\text{Piv}-\text{Cl}$ , рацемизацией при фрагментных конденсациях [2]. Это, возможно, объясняется большей реакционной способностью смешанного ангидрида карбоксикомпонента с диамидом фосфорной кислоты по сравнению с его смешанным ангидридом на основе пивалиновой кислоты, поэтому большая продолжительность конденсации во втором случае ведет к увеличению степени рацемизации карбоксикомпонента [48].

Еще одним достоинством  $\text{BOP}-\text{Cl}$  является возможность его использования в качестве конденсирующего реагента в одноклобвом методе синтеза, без выделения в отдельную стадию преактивации карбоксикомпонента, тогда как аналогичный метод с использованием  $\text{Piv}-\text{Cl}$  приводит к образованию до 40% N-пивалоилпептида [22], что объясняется более низкой по сравнению с карбоксилат-анионом активностью  $\text{BOP}-\text{Cl}$  к аминогруппе [49]. Однако лучшие результаты достигаются все же при проведении отдельной стадии получения смешанного ангидрида карбоксикомпонента и диамидфосфорной кислоты, так как в противном случае образуется некоторое количество примеси  $\text{BOP}$ -аминокомпонента [2].

Проведение стерически затрудненных конденсаций с помощью  $\text{BOP}-\text{Cl}$ , как и в случае  $\text{Piv}-\text{Cl}$ , может сопровождаться небольшой рацемизацией карбоксикомпонента даже при наличии уретановой защиты его аминогруппы. Например, в реакции  $\text{Z}-(\text{N-Me})\text{Val}$  с  $(\text{N-Me})\text{Val}-\text{OBu}-t\text{mpet}$  получено 4% эписмера [8]. В этом случае рацемизацию можно подавить добавкой  $\text{OBT}$ , но не  $\text{OSu}$  [2]. Однако при добавлении  $\text{OBT}$  общий выход дипептида резко падает (с 92 до 21%). Этот факт легко объясняется обусловленным стерическими факторами образованием  $\text{OBT}$ -эфира карбоксикомпонента, который является малоэффективным ацилирующим агентом в таких трудных конденсациях.

Интересно также отметить, что  $\text{BOP}-\text{Cl}$  оказался неэффективен в конденсациях C- $\alpha$ -метиламинокислот. Например, после проведения реакции  $\text{Boc}-\text{Aib}$  с  $\text{Aib}-\text{OBzl}$  не было обнаружено желаемого продукта [4].

К недостаткам использования  $\text{BOP}-\text{Cl}$  для активации как иминокислот, так и аминокислот можно отнести возможность диспропорционирования таких смешанных ангидридов, особенно при большой продолжительности реакции [2, 4]. Отмечается также относительно плохая растворимость  $\text{BOP}-\text{Cl}$  в некоторых органических растворителях, обычно применяемых в пептидном синтезе [41].

Вместо  $\text{BOP}-\text{Cl}$  для активации карбоксикомпонента может быть использован  $\text{BOP}$ -азид, который является достаточно устойчивым соединением. При проведении преактивации  $\text{BOP}$ -азидом (10 мин, 0° С) в конденсациях  $\text{Boc}-\text{Ala}$  с  $(\text{N-Me})\text{Phe}$  и  $\text{Z}-\text{Phe}$  с  $(\text{N-Me})\text{Ala}-\text{OMe}$  за 4 ч выход дипептидов составил 60% [50].

Описано использование в качестве активирующего реагента диэтилцианфосфиноксида, который в конденсации  $\text{Boc}-\text{Pro}$  с  $D-(\text{N-Me})\text{Phe}-D-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ant}-\text{OMe}$  (2 ч, 0° С; затем 24 ч, 20° С) привел к образованию пентапептида с выходом 89% [51].

В последнее время появились данные об использовании дифенилхлорфосфина в качестве высокоэффективного активирующего реагента, исполь-

зуемого в реакции ацилирования остатков иминокислот [13, 52—55]. Преимущества этого реагента перед  $\text{BOp}-\text{Cl}$  показаны на примерах активации как аминокислот, так и иминокислот в синтезе фрагментов циклоспорина [54]. Использование дифенилхлорфосфина для активации карбоксикомпонента с уретановой защитой аминогруппы не сопровождается рацемизацией последнего, а процесс образования смешанного ангидрида аналогичен активации с помощью  $\text{Piv}-\text{Cl}$  [53, 54]. К преимуществам дифенилхлорфосфина относится быстрота образования и устойчивость к диспропорционированию смешанных ангидридов на его основе [48, 56].

Из новых конденсирующих реагентов следует отметить бензотриазо-лилокси-*трет*-(диметиламино)фосфоний гексафторфосфат, с помощью которого осуществлена фрагментная конденсация по остатку  $(\text{N-Me})\text{Vmt}$  без рацемизации карбоксикомпонента [40, 57].

Использование прочих методов конденсации по иминокислотным остаткам носит эпизодический характер. Так, недавно был предложен новый реагент 1,2-дигидро-4,6-диметил-2-тиооксо-3-пиридинкарбонитрил, при употреблении которого был осуществлен синтез защищенного фрагмента циклоспорина (8—11) без рацемизации и с выходами на стадиях конденсации 80—87% [58]. Интересно, что этот реагент можно использовать для наращивания цепи как путем традиционной активации карбоксильной группы, так и путем активации аминогруппы аминокомпонента. Для осуществления конденсации в этом случае необходимо также наличие квимолярного количества трифенилфосфина [58].

Аидный метод иногда применяется для фрагментных конденсаций по остатку  $\text{Pro}$  [59].  $\text{N}$ -Карбоксиангидридный метод дает плохие результаты для подобных конденсаций [60]. Отмечаются хорошие результаты использования  $\text{K}$ -реагента Вудворда в твердофазном синтезе для ацилирования иминокислот [61].

### III. ПОБОЧНЫЕ РЕАКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ НАЛИЧИЕМ ИМИНОКИСЛОТ В ПЕПТИДАХ

Наряду с описанными выше особенностями использования иминокислот в пептидном синтезе, возникают также осложнения при получении их эфиров и амидов, а также при удалении защитных группировок. Все эти процессы идут значительно труднее или сопровождаются побочными реакциями, которые отсутствуют при работе с незамещенными аминокислотами.

Так, например,  $\text{Sar}-\text{OMe}$  может быть получен лишь с низким выходом при использовании раствора хлористого тионила в метаноле, тогда как  $\text{Gly}$  и многие другие аминокислоты в этих условиях дают очень хорошие выходы метиловых эфиров [62]. Третбутиловый эфир  $\text{Val}$  получают в течение 4 часов при  $20^\circ\text{C}$  с количественным выходом при использовании изобутилена в присутствии серной кислоты. В этих же условиях для  $(\text{N-Me})\text{Val}$  реакция не завершается даже за 96 ч [41].

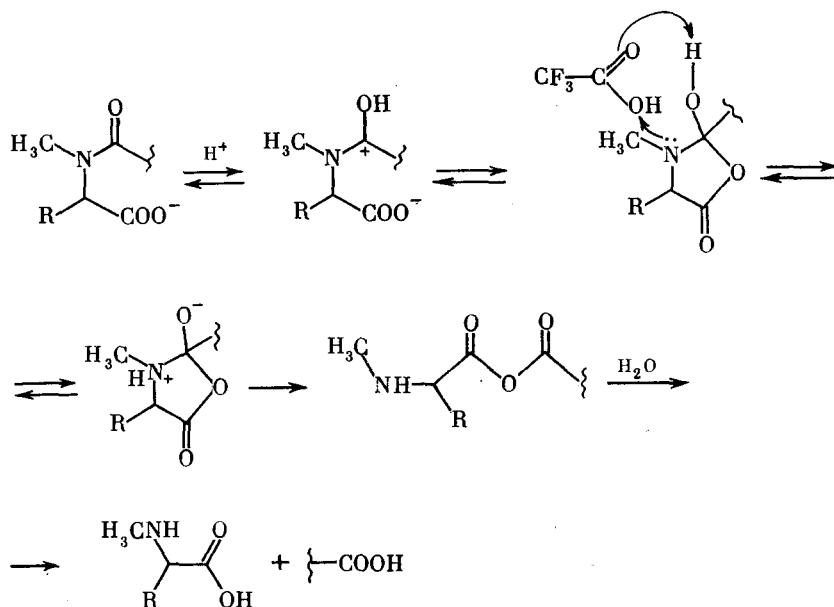
Омыление алкиловых эфиров иминокислот протекает значительно труднее, чем в случае соответствующих производных незамещенных аминокислот. Так, в одинаковых условиях скорость омыления  $\text{Sar}-\text{OMe}$  в 5 раз ниже, чем для  $\text{Gly}-\text{OMe}$  [62], а гидролиз  $\text{Lac}-\text{Pro}-D-(\text{N-Me})-\text{Leu}-\text{OMe}$  даже при трехкратном избытке гидроокиси натрия за 2 ч протекает лишь на 90% [19]. Отмечается также, что невозможно получить гидразид  $\text{Bz}-(\text{N-Me})\text{Val}$  из его метилового эфира действием гидразингидрата [21]. Аналогично затруднен и аммонолиз алкиловых эфиров иминокислот, поэтому их амиды получают путем обработки активированного эфира или смешанного ангидрида защищенной иминокислоты ами-



ном [6, 7, 63]. Иногда используют обходной метод, получая амид аминокислоты с последующим алкилированием ее аминогруппы [6, 7]. Аналогичный прием используют в синтезе фрагментов, состоящих только из иминокислот. Например, при обработке трипептида  $\text{Woc}-\text{Leu}-\text{Leu}-\text{Val}-\text{OBzl}$  иодистым метилом в присутствии окиси серебра происходит метилирование атомов азота во всех трех аминокислотных остатках [44]. Для предотвращения метилирования уретанового атома азота применяют более мягкие условия ( $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 18-краун-6, ДМФА,  $20^\circ\text{C}$ ) [64]. Такой метод синтеза трипептидных последовательностей из иминокислот позволяет избежать образования циклических дипептидов (ДКП) при конденсации «1 + 2» [44].

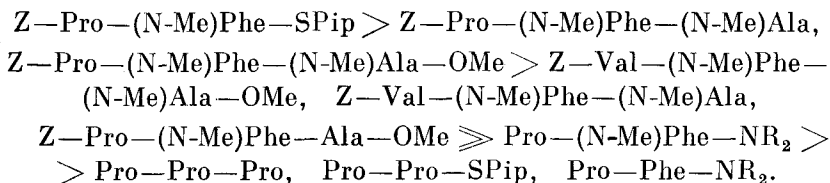
В последнее время появились данные о легком разрыве пептидной связи при обработке кислотами пептидов, содержащих последовательности из двух и более иминокислот [65, 66]. Предлагается два механизма, по которым может идти такое расщепление. Первый из них, когда процесс гидролиза не зависит от силы кислоты, в среде которой он протекает, получил название — экзопептолиз. Второй, зависящий от силы кислоты, был назван — эндопептолиз. Оба механизма предполагают легкость перехода пептидной связи в *цис*-форму и пространственное сближение соответствующих частей молекулы.

Экзопептолиз можно проиллюстрировать на примере дипептида  $\text{Tfa}-(\text{N-Me})\text{Phe}-(\text{N-Me})\text{Ala}$ , который в среде муравьиной кислоты расщепляется по пептидной связи за 120 ч при  $20^\circ\text{C}$  на 29%, а в трифторуксусной кислоте в тех же условиях — на 21% [65]. В то же время, алкиловые эфиры этого дипептида устойчивы в трифторуксусной кислоте [65, 66]. Авторы [65] предлагают следующий механизм экзопептолиза



Эндопептолиз характерен для трипептидов, построенных из иминокислот, причем N-концевое положение может быть занято остатком Gly. В кислой среде у таких трипептидов легко расщепляется пептидная связь между второй и третьей иминокислотой, особенно в тех случаях, когда N-концевой иминокислотой является Pto [66]. Скорость гидролиза таких трипептидов резко зависит от силы кислот, в среде которых осуществляется реакция: трифторуксусная  $\gg$  муравьиная  $\gg$  уксусная кислота. Чувствительность трипептидов к кислотному расщеплению пропорциональна

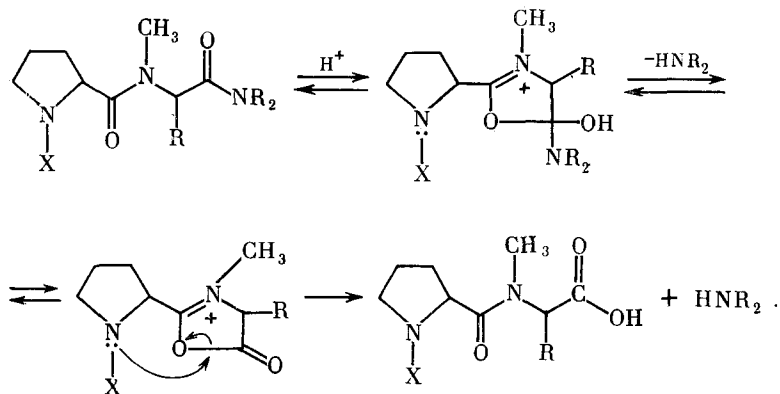
с терическому напряжению амидной связи между второй и третьей имино-кислотами, за исключением случая, когда в триаде первые два положения заняты остатками Pro [66]:



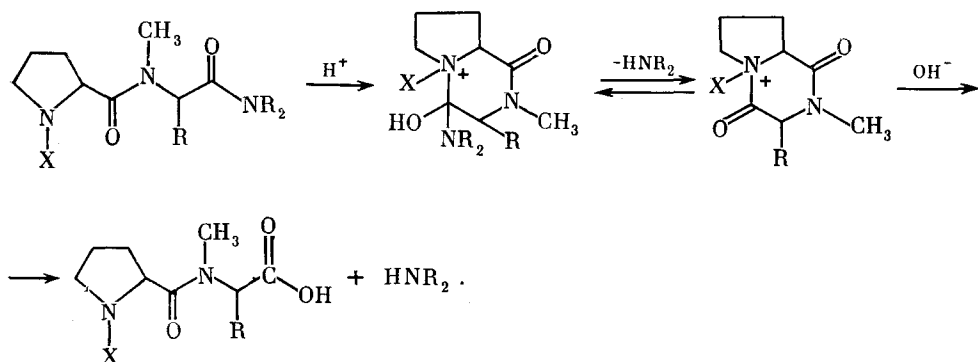
В некоторых случаях гидролиз идет настолько легко, что при деблокировании трипептида  $Z-\text{Abu}-\text{Pro}-(\text{N-Me})\text{Phe}-\text{SPip}-\text{O}iBu\text{-}trem$  отщепление С-концевой иминокислоты осуществляется быстрее, чем снимается третбутильная защита. Эндопептолиз затруднен, если в триаде N-концевой является незащищенная иминокислота или дипептид  $\text{Pro}-\text{Pro}$ . Если последовательность состоит из чередующихся *L*- и *D*-изомеров иминокислот (*L*-, *D*-, *L*-), то скорость эндопептолиза на два порядка ниже, чем для последовательностей, содержащих только *L*-изомеры. Так, трипептид  $Z-\text{Pro}-D-(\text{N-Me})\text{Phe}-(\text{N-Me})\text{Ala}-\text{O}iBu\text{-}trem$  в присутствии трифторуксусной кислоты не разлагается в течение нескольких суток, а его *L*-(*N-Me*)Phe аналог в тех же условиях полностью разлагается за 15 мин [2]. Дипептид  $Z-\text{Pro}-D-(\text{N-Me})\text{Phe}-\text{NMe}_2$  в трифторуксусной кислоте остается неизменным в течение суток, тогда как его *L*-аналог в тех же условиях за 14 ч полностью теряет группу  $-\text{NMe}_2$  [66]. Это может

Схема

#### оксазолониевый



#### дикетопиперазиновый

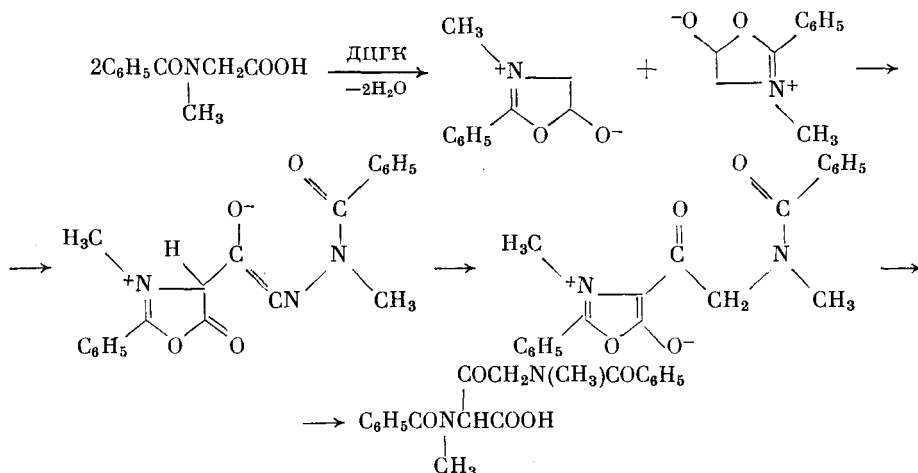


быть объяснено тем, что энергетический барьер перехода *транс*-амидной связи в *цис*-конфигурацию для *L*-, *D*-пары аминокислот в триаде выше, чем для *L*-, *L*-пары. Таким образом, вполне определенно можно считать, что при кислотной обработке конформационный фактор играет важнейшую роль в устойчивости пептидной связи между иминокислотами.

Для реакции эндопептолиза предложено два возможных механизма [66] (второй является более предпочтительным) (см. схему на с. 1826).

Аналогичные процессы, по-видимому, наблюдались и при синтезе циклоспорина, когда, например, деблокирование ундекапептида  $\text{Woc}-D\text{-Ala}-(\text{N-Me})\text{Leu}-(\text{N-Me})\text{Leu}-(\text{N-Me})\text{Val}-(\text{N-Me})-\text{Bmt}-\text{Abu}-\text{Sar}-(\text{N-Me})\text{Leu}-\text{Val}-(\text{N-Me})\text{Leu}-\text{Ala}$  раствором трифторуксусной кислоты в хлороформе при  $0^\circ\text{C}$  с последующей нейтрализацией избытка кислоты, приводило к сложной смеси продуктов, среди которых имелись пептиды с укороченными последовательностями. Избежать побочных реакций в этом случае удалось понижением температуры процесса деблокирования до  $-20^\circ\text{C}$  [40, 42].

Побочная реакция *C*- $\alpha$ -ацилирования остатка *Sar*, наблюдаемая при использовании карбодиимидного метода, также осуществляется по оксазольониевому механизму [67].



Чрезвычайно актуальной проблемой использования иминокислот в пептидном синтезе является легкость образования ДКП из некоторых производных пептидов. Прежде всего это касается реакций конденсации, где в качестве аминок компонента выступает эфир дипептида, содержащий *C*-концевую иминокислоту. В этом случае энергии *цис*- и *транс*-конфигураций пептидной связи близки, и для образования ДКП необходимо преодолеть значительно меньший энергетический барьер *транс-цис*-перехода (так как ДКП существуют только в виде *цис*-, *цис*-изомеров), чем в случае дипептида, не содержащего иминокислот [3, 5, 20, 68]. В рассмотренном случае образование ДКП чаще всего катализируется основаниями, особенно избытком третичного амина, часто присутствующим в реакционной массе [5, 68, 69]. Скорость образования ДКП, кроме присутствия катализатора, зависит от ряда факторов. Наличие боковых радикалов и радикалов у атома азота в иминокислотах, входящих в состав дипептида, дает энергетический выигрыш при образовании шестичленного ДКП-цикла за счет энтропийного фактора. Большое значение при нуклеофильной атаке карбонильного атома углерода аминогруппой имеют стерические препятствия, которые особенно возрастают при наличии в *N*-концевой аминокислоте бокового радикала [68, 69].

Скорость циклизации эфиров дипептидов, состоящих из двух имино-кислот, видимо, также достаточно высока за счет повышенной нуклеофильности вторичной аминогруппы [11]. Так, образование ДКП из дипептида  $(N\text{-Me})\text{Leu}-(N\text{-Me})\text{Val}-\text{OBzl}$  стало основным препятствием в синтезе фрагмента циклоспорины (7—11) при наращивании пептидной цепи с С-конца [22]. Процесс образования ДКП может не только конкурировать с синтезом пептида, но и полностью исключать возможность его получения при использовании в качестве аминокомпонента эфира дипептида. Особенно опасен этот процесс, видимо, при использовании в качестве аминокомпонента эфиров дипептидов, состоящих из двух иминокислот, так как в этом случае резко возрастает продолжительность конденсации при достаточно высокой скорости образования ДКП.

Наличие бокового радикала в С-концевой иминокислоте, по-видимому, не оказывает существенного влияния на скорость образования ДКП, в то время как вид третичного амина и растворителя, в котором проводится конденсация, сказываются существенно [68, 69].

Проблема образования ДКП из эфиров дипептидов с С-концевой иминокислотой характерна не только для синтеза в растворе, но и для твердофазного метода синтеза пептидов на основе хлорметилированной смолы. В случае такой полимерной подложки, ДКП легко образуется из замещенного бензильного эфира дипептида на стадии нейтрализации дипептидилполимера третичным амином после деблокирования [70]. В аналогичной ситуации, при использовании в качестве полимерной подложки сефадекса LH-20, также отмечено образование ДКП [71].

Кроме того наблюдалось, что при использовании ДЦГК-метода конденсации в твердофазном синтезе на хлорметилированной смоле, ДКП образуется и на стадии уравнивания дипептидилполимера раствором следующей аминокислоты [72]. В этом случае имеет место кислотный катализ образования ДКП, который нашел многочисленные подтверждения и в классическом методе синтеза пептидов. В этом случае ДКП чаще всего образуется при удалении защитных группировок у эфиров дипептидов кислотами, имеющими  $pK$  3—5. Конкретное выражение этот эффект находит при удалении Z-группы гидрированием в растворах, содержащих уксусную кислоту или, например, при удалении 2-(4-бифенилил)-пропил-2-оксикарбонильной защиты муравьиной кислотой [18, 73]. Механизм такого катализа, видимо, близок к механизму общего кислотного катализа.

Следует отметить, также, опасность образования ДКП из эфиров дипептидов с С-концевой иминокислотой при удалении Fmoc-защиты действием таких сильных органических оснований как пиперидин и диэтиламин [74, 75]. При использовании в этом случае 4-(аминометил)-пиперидина из бензильных эфиров дипептидов, даже не содержащих иминокислот, образуется 10—20% ДКП [74].

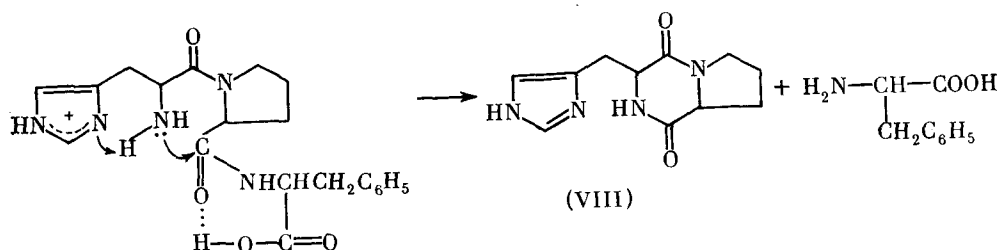
Если вместо алкилового или бензильного эфиров в реакцию конденсации вводится фенациловый эфир дипептида, то вероятность образования ДКП возрастает [5], поэтому для предупреждения этого процесса рекомендуется использовать третбутиловые эфиры дипептидов [3, 22].

В некоторых случаях циклизация в ДКП может иметь место даже у N-защищенных пептидов. Например, 4-нитрофениловый эфир дипептида  $Z\text{-Gly-Pro}$  образует  $(N\text{-Z})$ -замещенный ДКП, а в ходе конденсации  $Z\text{-(N-Me)Val}$  с  $(N\text{-Me})\text{-Val-OBu-}t\text{-рет}$  при использовании  $\text{BOP-Cl}$ , а особенно  $\text{Piv-Cl}$  при повышенной температуре, получается до 10% соответствующего ДКП, механизм образования которого не ясен [2, 75].

Из трипептида циннамоксикарбонил-Pro-(N-Me)Phe-(N-Me)Ala-OMe в процессе колоночной хроматографии на силикагеле образуется ДКП  $\text{цикло-}[(N\text{-Me})\text{Phe}-(N\text{-Me})\text{Ala}]$  и отщепляется защищенный Pro [76].

Хотя считается, что трифторацетаты и особенно гидрохлориды эфиров дипептидов, состоящие из любых аминокислот, вполне устойчивы [72], трифторацетат дипептида (N-Me)—Phe—(N-Me)—Ala—OMe превращается в ДКП при хранении в растворе хлороформа [76].

Известно также, что и амиды дипептидов, содержащих С-концевую иминокислоту, склонны к образованию ДКП [77, 78]. Например, дипептид Phe(4-NO<sub>2</sub>)—Pro—NH<sub>2</sub> образует ДКП в процессе перекристаллизации [78]. Отмечены отдельные случаи подобного трансамидирования при получении некоторых трипептидов. Так, при обработке трипептида His—Pro—Phe 50%-ной уксусной кислотой, за 24 ч при 20° С проходит отщепление Phe и образование ДКП (VIII). В тех же условиях трипептид Trp—Pro—Phe устойчив и не обнаруживает следов разложения в течение 24 ч. Промежуточное положение между этими соединениями по устойчивости занимает метиловый эфир первого трипептида. По мнению авторов [79], нестабильность трипептида His—Pro—Phe объясняется сочетанием благоприятных для образования ДКП конформационных факторов с так называемым внутримолекулярным катализом [79].

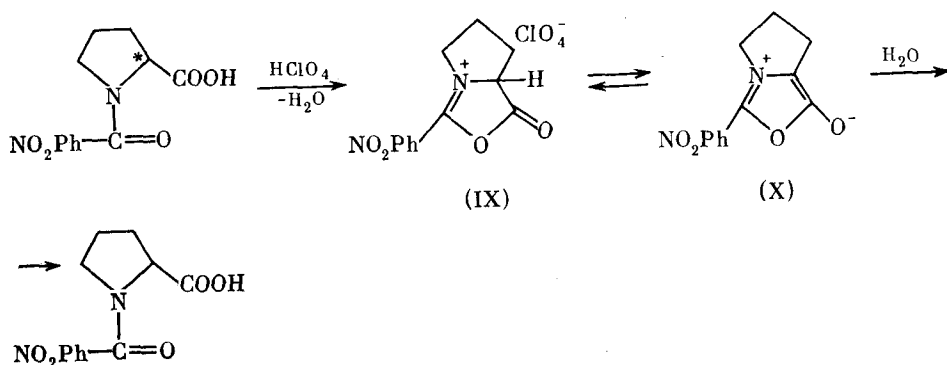


Описано также внутримолекулярное трансамидирование в трипептиде D-Val—Pro—Sar, который при хранении в течение 3 нед при 20° С разлагается на 50%. При этом отмечается, что у гидрохлорида этого пептида в тех же условиях не обнаруживалось признаков разложения [80].

Повышенную склонность к реакции внутримолекулярного трансамидирования показал и трипептид Aib—Pro—Trp [81].

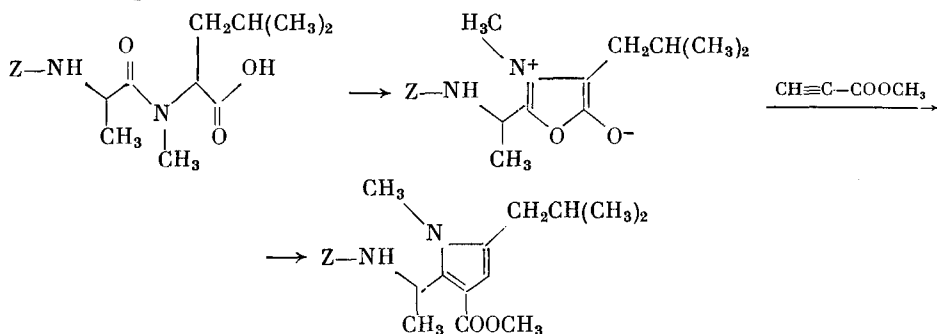
#### IV. РАЦЕМИЗАЦИЯ ИМИНОКИСЛОТ В ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ

Пролин является единственной широко распространенной в природе иминокислотой и давно используется в пептидном синтезе. Наряду с Gly, Pro отводится важная роль в качестве С-концевого остатка при фрагментных конденсациях, что связано с его высокой устойчивостью к рацемизации в процессах активации и удаления защитных группировок [3, 82]. Ранее это объясняли невозможностью осуществления оксазольониевого механизма рацемизации его N-ацилпроизводных вследствие отсутствия атома водорода на третичном атоме азота. Однако в 1972 г. было найдено, что N-ацилзамещенные Pro и другие иминокислоты при обработке хлорной кислотой могут давать стабильные оксазольониевые соли (IX) [67, 83].



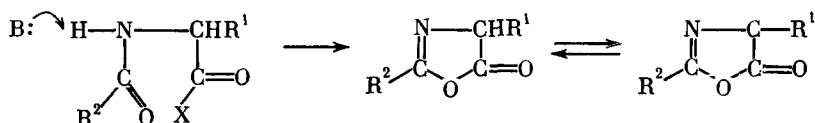
При хранении соли (IX) в присутствии безводной хлорной кислоты при 20° С имеет место полная рацемизация остатка Rго в течение 1 сут. Этот процесс связывают с равновесием в системе оксазольониевый ион (IX) — мезоионный оксазолон (X), так как при осаждении из реакционной среды соли (IX) сухим эфиром показано, что при ее хранении в сухом состоянии рацемизации не происходит [67]. Эти факты служат доказательством возможности рацемизации (N-ацил)Rго по оксазольониевому механизму, но образование из него мезоионного оксазолона (X), в силу конформационных ограничений, затруднено и происходит лишь в присутствии сильноокислых реагентов (хлорная кислота). Для других иминокислот степень структурных ограничений гораздо ниже, чем у Rго и образование мезоионного оксазолона с последующей изомеризацией наблюдается в мягких условиях пептидного синтеза. Более того, их чувствительность к рацемизации по оксазольониевому механизму чрезвычайно высока.

Образование мезоионного оксазолона (X) сопровождается появлением быстро исчезающего ярко-желтого, специфического ( $\lambda_{\text{max}}$  поглощения = 400 нм) окрашивания реакционной массы. В дальнейшем его образование удалось зафиксировать в результате реакции с 1,3-диполярфилом — ацетиленкарбоновой кислотой [3]



В 1981 г. методом ПМР спектроскопии зафиксировали сигналы мезоионного оксазолона (X) при взаимодействии Z—(N-Me)Val, а также Z—(N-Me)Ala с ДЦГК и установили, что этот ион стабилен в дейтерохлороформе при температуре  $-20 \div -5^\circ \text{C}$  в течение 3 ч [21].

Если образование 5(4H)-оксазолонов при активации N-ациламинокислот обусловлено основным катализом,



то в случае N-ацилиминокислот имеет место кислотный катализ образования мезоионного оксазолона (X) [65, 67, 83]. Поэтому присутствие солей сильных кислот и третичных аминов, спутников почти любой пептидной конденсации, нежелательно в реакционной массе [3, 28]. Избыток третичного амина уменьшает рацемизацию иминокислотных остатков при использовании ДЦГК и изобутилхлорформиата в качестве конденсирующих реагентов [3]. При этом более сильное основание — триэтиламин более эффективен чем N-метилморфолин.

При обработке производных N-ацилиминокислот сильными кислотами, например, при декарбобензоксидировании дипептида Z—Ala—(N-Me)—Leu раствором бромистоводородной кислоты (5,6N) в уксусной кислоте,

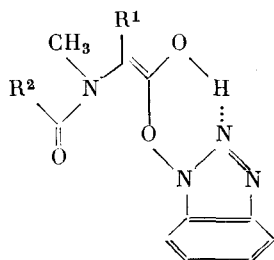
имеет место значительная рацемизация, которую авторы связывали с кислотно-катализируемой енолизацией [82]. Однако тот факт, что добавка воды в этом случае резко снижала степень рацемизации, свидетельствует о том, что в данном случае имеет место не кислотно-катализируемая енолизация, а образование мезоионного оксазолонина в безводной среде.

Рацемизация производных иминокислот путем енолизации может катализироваться как щелочами, так и кислотами, а ее механизм, очевидно, тот же, что и в случае производных обычных аминокислот [20, 83].

Следует отметить, что рацемизация производных иминокислот редко идет только по одному механизму. Чаще, в зависимости от многих факторов, может преобладать или оксазолониевый механизм или енолизация.

К числу факторов, влияющих на механизм рацемизации, относятся: метод активации, природа заместителей в остатке иминокислоты, полярность используемого для конденсации растворителя, pH среды и т. п. К настоящему моменту выявлены определенные закономерности в этой проблеме.

В частности, использование таких хорошо известных антирацемизационных добавок как OBT или OSu при активации N-ацилиминокислот с помощью ДЦГК подавляет их рацемизацию по оксазолониевому механизму [3, 21]. При этом OSu оказался более эффективен, чем OBT, который, подавляя образование оксазолониевого иона, способствует рацемизации по механизму енолизации, являясь стабилизатором енольной структуры OBT-эфира N-алкиламинокислоты [21]



В конденсации Boc—Abu—Sar с (N-Me)Leu—Val—(N-Me)Leu—Val—(N-Me)Leu—Ala—OBzl методом смешанных ангидридов пивалиновой кислоты не наблюдалась побочная реакция C- $\alpha$ -ацилирования, которая идет через образование мезоионного оксазолонина (типа (X), см. предыдущую гл.) [40]. Процесс рацемизации в этом случае, как и при активации ДЦГК, подавляется избытком триэтиламина более эффективно, чем N-метилморфолином. Это может служить косвенным подтверждением того, что рацемизация иминокислот при их активации Piv—Cl обусловлена кислотно-катализируемой енолизацией, а не образованием оксазолониевого иона [40].

Установлено также, что рацемизация при использовании BOP, BOP—Cl и дифенилхлорфосфина в качестве активирующих реагентов для N-ацилиминокислот преимущественно обусловлена образованием оксазолониевого иона [2, 40].

При использовании BOP—Cl, добавки OBT или OSu малоэффективны [84]. По другим данным OBT слабо влияет на подавление рацемизации, а OSu не эффективен совсем [2, 85]. Отмечается, что при циклизации шестичленного пептида с активацией остатка (N-Me)Phe с помощью BOP—Cl, добавка OBT даже вдвое повышала рацемизацию последнего [86].

Как и в случае обычных аминокислот, уретановая защита N-алкиламиногруппы надежно предотвращает рацемизацию иминокислот [3, 21, 22, 40]. Например, при проведении реакции Boc—(N-Me)Leu с (N-Me)·Val—OBzl с использованием Piv—Cl, даже при 50° C, продукт не содержит диастереомерной примеси [22]. Только в случаях самых стерически

затрудненных конденсаций, когда продолжительность реакции велика, наблюдается небольшая степень рацемизации иминокислот с уретановой защитой. Например, эимеризация остатка (N-Me)Val, активированного BOP—Cl, в реакции Z—(N-Me)Val с (N-Me)Val—O*Bu-трет*, через 2 сут при 20° С составила 4%, а через 4 сут при 0° С — менее 1% [2].

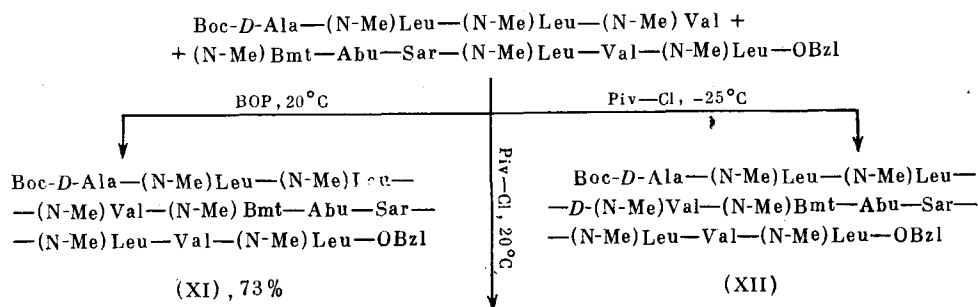
Ранее считалось, что наличие уретановой защиты предотвращает рацемизацию аминокислот по оксазолонному механизму [20]. Позднее было установлено, что уретановая защита не может быть надежным препятствием образованию 5(4H)-оксазолонов. В некоторых условиях, например при избытке ДЦГК в реакционной массе, из таких производных аминокислот также образуются оксазолонны, но они чрезвычайно устойчивы к таутомерным превращениям, которые обуславливают процесс рацемизации [11, 87]. Однако наличие избытка третичного амина в этом случае может приводить к заметной рацемизации [11].

При активации N-ацилиминокислот ДЦГК-методом рацемизация оказывается весьма значительной, если в качестве ацильных групп используют ацетил или бензоил. Если же ацильной группой является аминокислотный остаток, то рацемизация проявляется в меньшей степени [21].

Среди факторов, влияющих на рацемизацию производных аминокислот, которые до последнего времени мало обсуждались в печати, можно отметить так называемую асимметрическую индукцию [88, 89]. Это явление объясняет высокую степень рацемизации C-концевых аминокислотных остатков при активации или деблокировании, когда в процессе рацемизации образуется энергетически более выгодный эимер [22]. Данный процесс может приводить к преимущественному образованию продукта с обращенной конфигурацией, поэтому термин «рацемизация» в этом случае неприемлем и следует говорить о высокой степени эимеризации.

С другой стороны, асимметрическая индукция может быть обусловлена различной реакционной способностью L- или D-активированных аминокислот по отношению к асимметрическому аминокислотному компоненту. Таким образом, если активировался L-изомер, а в реакцию легче вступает D-изомер, то в результате эимеризации, идущей параллельно с конденсацией, в качестве основного можно получить продукт, содержащий остаток преимущественно D-аминокислоты [11, 89]. В некоторых случаях этот процесс приводит к полному обращению конфигурации вводимой аминокислоты [40].

В некоторых случаях явление асимметрической индукции может стать очень ценным приемом синтеза определенных эимеров, которые сложно получить классическими способами. Так, при получении защищенного ундекапептида, полупродукта в синтезе циклоспорины, фрагментной конденсацией «4 + 7» из одних и тех же карбокси- и аминокислотных компонентов, в зависимости от условий реакции, были получены два эимера в индивидуальном состоянии [40]



Смесь (XI) и (XII) в соотношении 4:1



Здесь, при активации тетрапептидного фрагмента с помощью  $\text{Piv-Cl}$ , рацемизация остатка  $(\text{N-Me})\text{Val}$  идет через образование енола и, вследствие отсутствия стерических ограничений для этого процесса, образуется энергетически более выгодная последовательность *D*- и *L*-аминокислот. При активации того же тетрапептида с помощью  $\text{BOP}$  образуется оксазольониевый ион, который в силу стерических ограничений может реагировать только в *L*-форме [40].

Повышенную склонность производных иминокислот, кроме  $\text{Pro}$ , к рацемизации при щелочной или кислотной обработке ранее объясняли легкостью енолизации этих соединений в указанных условиях [82]. Облегченную енолизацию связывали с отсутствием атома водорода при атоме азота в третичных амидах, каковыми являются *N*-ацилиминокислоты.

Водородный атом в *N*-ациламинокислотах значительно более подвижен, чем атом водорода при углеродном атоме. Таким образом, ионизируясь в первую очередь, амидный атом водорода предотвращает депротонирование у углеводородного атома, что обеспечивает более высокую устойчивость аминокислот к рацемизации, по сравнению с иминокислотами.

Экспериментальным подтверждением сказанному выше служит тот факт, что щелочная обработка  $(\text{N-Me})\text{Ile-OMe}$  дает 1% эписмера, тогда как  $\text{Z-(N-Me)Ile-OMe}$ , не имеющий водородного атома при атоме азота, в тех же условиях дает 9% эписмера. Аналогично, в щелочных условиях ионизация карбоксильной группы предупреждает образование енола, а следовательно, и рацемизацию  $\text{Z-Ile}$  [83].

Отмечается также, что дополнительным фактором, облегчающим енолизацию иминокислот, является электронодонорный эффект *N*-алкильной группировки. Однако приведенные механизмы енолизации не могут объяснить высокую устойчивость к рацемизации остатка  $\text{Pro}$  в дипептиде  $\text{Woc-Ala-Pro-OMe}$  (менее 0,1% эписмера в 1*N* гидроксиде натрия за 3 ч) [82].

Есть указания, что повышенную склонность к рацемизации производных иминокислот нельзя в полной мере объяснить отсутствием препятствующего енолизации атома водорода у полностью замещенного атома азота [20]. Для того чтобы этот механизм в достаточной мере оправдал себя, необходимо, чтобы свыше 90% амидных групп в пептиде, состоящем из обычных аминокислот, в условиях омыления, были превращены в сопряженные основания, что маловероятно, так как *pK* для монозамещенных амидов лежит в пределах 14—15. Кроме того, эти механизмы не объясняют повышенной рацемизации, связанной с образованием мезоионного оксазолонина. На основании того, что дизамещенные амиды, каковыми являются *N*-ацилиминокислоты, существуют в виде близких по энергии *цис*- и *транс*-конформеров, а монозамещенные амиды имеют преимущественно *транс*-конформацию амидной связи, высказано предположение, что *цис*-конформация, более легко осуществимая в *N*-ацилиминокислотах, облегчает процесс рацемизации [20]. Косвенным подтверждением этому предположению является известная легкость рацемизации иминокислотных остатков в циклических дипептидах при щелочных обработках. В ДКП обе амидные связи имеют только *цис*-конфигурацию [90]. Видимо, именно стерические факторы вносят решающий вклад в облегчение рацемизации производных иминокислот.

\* \* \*

На основании рассмотренного выше материала можно заключить, что ни один из традиционных методов конденсации не может гарантировать успеха при ацилировании остатков иминокислот, за исключением самых

легких случаев. Такие реагенты, как дефинилхлорфосфин,  $\text{BOR}-\text{Cl}$  и  $\text{Piv}-\text{Cl}$  позволяют осуществить наиболее стерически затрудненные конденсации. В последнее время для этих целей наиболее широко применяется  $\text{BOR}-\text{Cl}$ . При синтезе пептидов, содержащих иминокислоты, а особенно последовательности из нескольких иминокислот, резко повышается риск получения нестабильных соединений, которые могут разлагаться по различным схемам. Опасность разложения таких пептидов особенно велика в процессе ацидолиза при удалении защитных группировок.

Чрезвычайно острой является также проблема побочного образования ДКП, что в ряде случаев требует изменения стратегии синтеза пептидов, содержащих иминокислоты.

Предотвращение или снижение степени рацемизации остатков иминокислот в ходе пептидного синтеза в целом может быть достигнуто известными методами: уретановая защита, антирацемизационные добавки. Однако эффективность этих методов сильно зависит от вида вступающих в реакцию карбокси- и аминокомпонентов, а также от используемого конденсирующего реагента. При использовании  $\text{BOR}$  и  $\text{BOR}-\text{Cl}$ , рацемизация иминокислотных остатков в основном обусловлена образованием оксазольониевого иона, а при употреблении  $\text{Piv}-\text{Cl}$  — кислотнo-катализируемой енолизацией.<sup>1</sup>

## ЛИТЕРАТУРА

1. IUPAC — IUB // Eur. J. Biochem. 1984. V. 138. № 1. P. 9.
2. Auwera C., Anteunis M. J. O. // Int. J. Pept. Prot. Res. 1987. V. 29. № 5. P. 574.
3. McDermott J. R., Benoiton N. L. // Can. J. Chem. 1973. V. 51. № 15. P. 2562.
4. Tung R. G., Rich D. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V. 107. P. 4342.
5. The Peptides / Eds. E. Cross, J. Meienhofer. N. Y.: Academ. Press., 1980. V. 2. Pt A. P. 596.
6. Пат. 4322340 США // С. А. 1982. V. 97, 39409.
7. Пат. 4265808 США // С. А. 1981. V. 95, 116010.
8. Szirter T., Kisfaludy L., Palosi E. et al. // J. Med. Chem. 1984. V. 27. № 6. P. 747.
9. Филатова М. П., Крив Н. А., Комарова О. М. и др. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 59.
10. Porseo G., Gigli M., Castiglione R. // Int. J. Pept. Prot. Res. 1987. V. 29. № 4. P. 478.
11. The Peptides / Eds. E. Gross, J. Meienhofer N. Y.: Academ. Press, 1983. V. 5. Pt B. P. 508.
12. Savrda J. // J. Org. Chem. 1977. V. 42. № 19. P. 3199.
13. Galpin V. J., Mohammed A. K., Patel A. // Tetrahedron. 1988. V. 44. P. 1685.
14. Sheehan J. C., Heesw G. P. // J. Amer. Chem. Soc. 1955. V. 77. P. 1067.
15. Myokei R., Sakurai A., Chang C. et al. // Tetrahedron Lett. 1969. V. 10. № 9. P. 1501.
16. Chang C., Myokei R., Sakurai A. et al. // Agric. Biol. Chem. 1969. V. 33. № 10. P. 1501.
17. Иванов В. Т., Лавринович И. А., Лапшин В. В. // Химия природ. соединений. 1975. № 1. С. 63.
18. Shin M., Inouye K., Otsuka H. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1978. V. 51. № 5. P. 1501.
19. Join P., Poncet J., Dufour M. N. et al. // J. Org. Chem. 1989. V. 54. № 3. P. 617.
20. Пептиды. Основные методы образования пептидных связей / Под. ред. Э. Гросса, И. Майенхофера. М.: Мир, 1983. С. 421.
21. Davies J. S., Mohammed A. K. // J. Chem. Soc. Perkin I. 1981. № 11. P. 2982.
22. Wenger R. M. // Helv. Chim. acta. 1983. V. 6. № 8. P. 2672.
23. Meienhofer J. // J. Org. Chem. 1967. V. 32. № 4. P. 1143.
24. Равдель Г. А., Монапова Н. Н., Крив Н. А. и др. // Химия природ. соединений. 1975. № 1. С. 47.
25. Андронати С. А., Коротенко Т. И. // Там же. 1986. № 2. С. 222.
26. Андреев С. М., Галкин О. М., Рогожин С. В. и др. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 6. С. 725.
27. Антоненко В. В., Прудченко И. А., Михалева И. И. и др. // Там же. 1987. Т. 13. № 10. С. 1301.
28. Calas B., Michelot R., Lecaer J. P. et al. // Int. J. Pept. Prot. Res. 1987. V. 29. № 2. P. 170.

29. *Yajima H., Ocada Y., Kawatani H. et al.* // Chem. Pharm. Bull. 1969. V. 17. № 6. P. 1229.
30. *Yajima H., Mizokami N., Okada Y. et al.* // Ibid. 1969. V. 17. № 9. P. 1958.
31. *Beyerman H. C.* // Chemistry and Biology of Peptides / Ed. J. Meienhofer Ann Arbor, Michigan, 1972. P. 357.
32. *Yajimata H., Mizokami N., Okada Y. et al.* // Chem. Pharm. Bull. 1969. V. 17. P. 1958.
33. *Albertson N. F.* // Org. React. 1962. V. 12. P. 157.
34. *Ondetti V. F., Thomas P. L.* // J. Amer. Chem. Soc. 1965. V. 87. P. 4373.
35. *Rydon H. N., Smith P. W. G.* // J. Chem. Soc. 1956. P. 3642.
36. *Sole N., Torres J., Garcia-Anton J. et al.* // Tetrahedron. 1986. V. 42. № 1. P. 193.
37. *Chen F. M. F., Lee Y., Steinauer R. et al.* // Can. J. Chem. 1987. V. 65. № 3. P. 613.
38. *Pless J., Bauer W., Cordinaux F. et al.* // Helv. Chim. acta. 1979. V. 62. № 2. P. 398.
39. *Chen F. M. F., Lee Y., Steinauer R. et al.* // Can. J. Chem. 1987. V. 65. № 3. P. 619.
40. *Wenger R. M.* // Helv. Chim. acta. 1984. V. 67. № 2. P. 502.
41. *Tung R. D., Dhaon M. K., Rich D. H. et al.* // J. Org. Chem. 1986. V. 51. № 17. P. 3350.
42. *Rich D. H., Dhaon M. K., Dunlap B. et al.* // J. Med. Chem. 1986. V. 29. № 6. P. 978.
43. *Zaoral M.* // Collect. Czech. Chem. Commun. 1962. V. 27. № 5. P. 1273.
44. *Романова В. П., Шилин В. В.* // Укр. хим. журн. 1989. Т. 55. № 5. С. 527.
45. *Warnke J. G., Young G. T.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1980. № 12. P. 2797.
46. *Унковский В. И., Васильева Г. А., Евстигнеева Р. П.* // Журн. общ. химии. 1983. Т. 53. С. 216.
47. *Diago-Meseguer J., Polamo-Coll A. L.* // Synthesis. 1980. № 7. P. 547.
48. *Jacson A. G., Kenner G. W., Moore G. A. et al.* // Tetrahedron Lett. 1976. V. 17. № 40. P. 3627.
49. *Omodei-Sale A., Sindona G., Sola D. et al.* // J. Chem. Res. Synop. 1984. № 2. P. 50.
50. *Katti S. B., Misra P. K., Haq W. et al.* // Indian J. Chem. 1988. V. 27. № 1. P. 3.
51. *Kazunari N., Yasumasa H., Takayki S.* // Chem. Pharm. Bull. 1989. V. 37. № 4. P. 930.
52. *Galpin V. J., Mohammed A. K., Pattel A.* // Tetrahedron. 1988. V. 44. P. 1783.
53. *Galpin I. J., Mohammed A., Pattel A. et al.* // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 51. P. 6517.
54. *Galpin I. J., Mohammed A., Pattel A. et al.* // Tetrahedron. 1988. V. 44. № 6. P. 1763.
55. *Galpin I. J., Mohammed A., Pattel A. et al.* // Ibid. 1988. V. 44. № 6. P. 1773.
56. *Galpin I. J., Robinson A. E.* // Ibid. 1984. V. 40. P. 627.
57. *Coste J., Dufour M. N. et al.* // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 5. P. 669.
58. *Schmidt U., Potzoll B.* // Lieb. Ann. Chem. 1987. № 11. S. 935.
59. *Sofuku S., Sugiyama Y., Muramatsu I.* // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1986. V. 59. № 1. P. 185.
60. *Cheung S. T., Benoiton N. L.* // Can. J. Chem. 1977. V. 55. № 5. P. 911.
61. *Khosla M. C., Munoz-Ramizer H., Hall M. M. et al.* // J. Med. Chem. 1976. V. 19. № 2. P. 244.
62. *Purdie J. E., Benoiton N. L.* // Can. J. Chem. 1971. V. 49. № 21. P. 3468.
63. *Meienhofer J., Vigneaud V.* // J. Amer. Chem. Soc. 1961. V. 83. № 1. P. 142.
64. *Judson E., Lax A. R., Lillehoj E. B. et al.* // Int. J. Pept. Prot. Res. 1986. V. 28. № 6. P. 603.
65. *Auwers C., Anteunis M. J. O.* // Ibid. 1988. V. 31. № 2. P. 186.
66. *Anteunis M. J. O., Auwers C.* // Ibid. 1988. V. 31. № 3. P. 301.
67. *Boyd G. V., Wright P. H.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1972. № 7. P. 914.
68. *Purdie J., Benoiton N. L.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1973. № 14. P. 1845.
69. *Gaines S. H., Bada J. L.* // J. Org. Chem. 1988. V. 53. № 12. P. 2757.
70. *Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. № 13. P. 4721.
71. *Власов Г. П., Гусель В. А., Кожевникова М. Ю. и др.* // Журн. общ. химии. 1986. Т. 56. № 7. С. 1635.
72. *Gisin B. F., Merrifield R. B.* // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. № 9. P. 3102.
73. *Shute R. E., Rich D. H.* // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1987. № 15. P. 1155.
74. *Beyerman M., Bienert M., Repke H. et al.* // XIX Eur. Pept. Symp. Porto. Carras. 1986. P. 107.
75. *Pedroso E., Grandas A., Heras X. et al.* // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 6. P. 743.
76. *Sharma N. K., Anteunis M. J. O.* // Bull. Soc. Chim. Belg. 1987. V. 96. № 6. P. 467.

77. Гринштейн Д., Винуц М. // Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965. С. 821.
78. Hardy G. W., Lowe L. A., Sang P. Y. et al. // J. Med. Chem. 1988. V. 31. № 5. P. 960.
79. Mazur R. H., Schlatter J. M. // J. Org. Chem. 1963. V. 28. № 4. P. 1029.
80. Meienhofer J. // J. Amer. Chem. Soc. 1970. V. 92. № 12. P. 3771.
81. Gerig J. T., McLeod R. S. // J. Org. Chem. 1976. V. 41. P. 1653.
82. McDermott J. R., Benoiton N. L. // Can. J. Chem. 1973. V. 51. № 15. P. 2555.
83. Boyd G. V., Wright P. H. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1972. № 7. P. 909.
84. Kolodziejczyk A. M., Wodecki Z. J. // XIX Eur. Pept. Symp. Porto Carras. 1986. P. 115.
85. Auvera C., Van Damme S., Anteunis M. J. O. // Int. J. Pept. Prot. Res. 1987. V. 29. № 4. P. 464.
86. Anteunis M. J. O., Sharma N. K. // Bull. Soc. chim. Belg. 1988. V. 97. № 4. P. 281.
87. Benoiton N. L., Chen F. M. F. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1981. № 23. P. 1225.
88. Benoiton N. L., Kuroda K., Chen F. M. F. // Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. № 35. P. 3359.
89. Benoiton N. L., Kuroda K., Chen F. M. F. // Ibid. 1981. V. 22. № 35. P. 3361.
90. Ott H., Frey A. J., Hofmann A. // Tetrahedron. 1963. V. 19. P. 1675.

Государственный союзный научно-исследовательский  
институт органической химии и технологии, Москва