

Междуфазов пептиден синтез. Техники и приложение

Станислав Г. Байрямов

Interphase peptide synthesis. Techniques and application. *The interphase peptide synthesis plays an important and uncial role in peptide synthesis, during the process of amide bond formation. This method allows a phase-controlled reagents transfer, as well as the reagents interaction, during the synthesis procedure, leading to the desired product formation.*

Keywords: *interphase peptide synthesis, phase transfer, peptide synthesis, protective groups.*

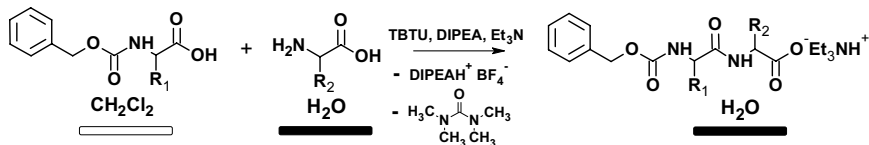
ВЪВЕДЕНИЕ

Междуфазовият пептиден синтез може да намери изключително приложение както за целите на научните изследвания, така и за нуждите на индустрията - за производството на различни биологично активни препарати. Наред с класическия пептиден синтез в разтвор, както и твърдофазния синтез – недостатъците, които съществуват в процедурите за синтез при тези два метода, се преодоляват с тънкостите на междуфазовия пептиден синтез. Той от своя страна позволява контролираното преминаване и реагиране на веществата от едната – в другата фаза, предотвратяващ по този начин протичането на нежелани странични реакции.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Стандартният класически пептиден синтез в разтвор води началото си от първото десетилетие (зората) на XX век (1901г.), с работите на великия химик-органик Емил Фишер (**Hermann Emil Fisher**) [1, 2], който разработва методологията за създаване на пептидна връзка и синтез на пептиди в разтвор. Първите защитни групи за аминокрупата на аминокиселините са били от ацилен тип, предизвикващи обаче рацемизация в хода на пептидния синтез, което наложи търсенето на подходящи защити. Това търсене се увенчава с успех с работите на **Bergmann** и **Zervas** [3, 4, 5] през 30-те години на миналия век. Те откриват бензилоксикарбонилната група или карбобензоксигрупа (Z), носеща името на единия от своите откриватели. Впоследствие се откриват 9-флуоренилметил оксикарбонилната защитна група (Fmoc) [6], играеща основна роля в твърдофазния пептиден синтез, и трет-бутил оксикарбонилната група (Boc) [7], увенчана с изключителен успех при синтеза в разтвор. Всички споменати групи са от т. нар. уретанов тип, предотвратяващи нежеланите рацемизации в процеса на образуване на пептидна връзка. От своя страна за защита на карбоксилната група се използва естерен тип защита, въведена още от самия Емил Фишер. В началото на 80-те години на миналия век **Bruce Merrifield** [8] създава твърдофазния пептиден синтез, с използване на полимерна матрица. Матрицата, която избира е полимер (полистирен, полистирол), носещ функционални групи на повърхността си (p-хидроксиметилни). Това е първата смола, по-късно носеща името на своя създател. По-късно бяха създадени и внедрени други видове смоли: смола на Wang, 2-Cl-третил хлоридна смола и др. При твърдофазния синтез, процесът всъщност е хетерогенен, осъществен между реагентите в разтвор и тези функционални групи, носени от матрицата. Той намери изключително приложение в съвременната лекарствена химия, която е немислима без този метод, поради бързината на протичане на реакциите и рутинността си. Твърдофазният метод за синтез значително съкращава времето на протичане на дадена реакция, в сравнение с метода за синтез в разтвор. Естествено, като всеки метод и той освен предимства пред класическия пептиден синтез в разтвор, си има и своите недостатъци. Освен малките количества, с които методът разполага като капацитет за синтез, поради големия брой странични продукти и тяхното нарастване, с нарастването на дължината на пептида, се налага

пречистването на основния продукт от ненужните примеси с помощта на Високо-ефективна течна хроматография (HPLC). От своя страна методът за **междофазов синтез** (Фиг. 1) предлага нови възможности и се характеризира с качествени черти, отличаващи го от другите два метода, както и правещи го специфичен спрямо тях. От една страна при този подход се постига контролиран пренос на реагентите и катализаторите от една фаза в друга. Това позволява умерено и контролирано взаимодействие между реагентите от една страна, а от друга страна позволява избягването на нежеланите странични реакции. Освен това, при този метод не се налага защита на аминокиселината като естер, при използването на еквивалентно базово количества (количество база), а се позволява протичането на реакция между N-защитената аминокиселина и свободна аминокиселина, с което се избягва от една страна стъпката на предварителна защита на карбоксилната група на аминокиселината, а от друга се предотвратява последващата (след синтез) стъпка на деблокиране (хидролиза) на естерната метилна група на образуваният пептид в случай, че се налага последващо нарастване на образуваният пептид в посока към С-края. Това е възможно благодарение на образуването *in situ* на активиран хидроксibenзотриазолов активиран естер на N-защитената аминокиселина, с което се предотвратяват нежеланите странични реакции на образуване на симетричен дикетопиперазин от аминокиселината. Също така, поради трудноразтворимостта на някои компоненти: **TBTU**, **HOBT**, както и на някои хлороводородни соли на метилови естери на аминокиселините (ако се налага използването на метилови естери – например при синтез от С-края към N-края) в органични разтворители, се използва тази двуфазова система: органичен разтворител - вода*, с което се предотвратява този нежелан ефект от различните свойства на аминокиселините, т. е. те успешно се разтварят във вода.



Фиг. 1. Схема за междофазов пептиден синтез с N-Z-защитена аминокиселина⁰ (като ацилна компонента) и свободна аминокиселина[‡] (като аминокиселина компонента).

⁰ Авторът е използвал също така и N-Вос – защитена аминокиселина като ацилна компонента

[‡] Авторът е използвал също така и карбокси защитена аминокиселина (метилов естер), като аминокиселина компонента.

При този метод имаме две взаимно несмесваеми системи (фази) от разтворители с различни полярни свойства, като реагентите се разполагат в двете фази в зависимост от тяхната хидрофилност и хидрофобност (съответно липофилност и липофобност), от което следва разтворимостта им в тях (Фиг. 2). При това, контролирани количества преминават от едната в другата фаза и реагират помежду си. Благодарение на ниската (по-скоро умерената) разтворимост на диизопропиламониите соли на изходните N-защитени аминокиселини компоненти, както и триетиламониите соли на продуктите, в органични разтворители (етилацетат или CH_2Cl_2) се осигурява умерено и контролирано фазово разпределение на реагентите и продуктите на реакцията. Продуктите на реакцията също имат различно фазово разпределение, което позволява тяхното по-лесно отделяне и пречистване от реакционната смес (Фиг. 2). Обикновено във всяка една двуфазова система, единият от задължителните компоненти е вода*, осигуряваща среда за разтварянето на един или повече компоненти в една реакционна система. Другият компонент трябва да е задължително органичен разтворител, несмесваем с водата*.

* При осъществяването на синтез във вода, който авторът успешно разработва и е в процес на усъвършенстване, не се налага използването на органичен разтворител, тъй като всички компоненти при подходящи условия се разтварят във вода, а освен това, в разрез с предишните (класическите) твърдения, водата не оказва отрицателно влияние (не пречи) на успешното протичане на кондензационната реакция, защото не нарушава образуването на активираното N-защитено аминокиселинно производно. Единствено последващото стандартно разработване на реакцията (стандартните промивания на реакционната смес) изискват използването на органичен разтворител. При използването на карбокси защитена аминокиселина като аминокомпонента, реакционният продукт директно се утаява и това позволява директното филтруване из водната фаза, промиване и изолиране, чрез последвала прекристализация на веществото. При използването на свободна аминокиселина като аминокомпонента, реакционният продукт може да се утаи след предварително подкисляване на реакционната смес и това позволява директното филтруване на утаения продукт из водната фаза, промиване и изолиране, чрез последвала прекристализация на веществото. По този начин технологията поевтинява и това има изключително значение при прилагането ѝ за индустриални цели (в производството).

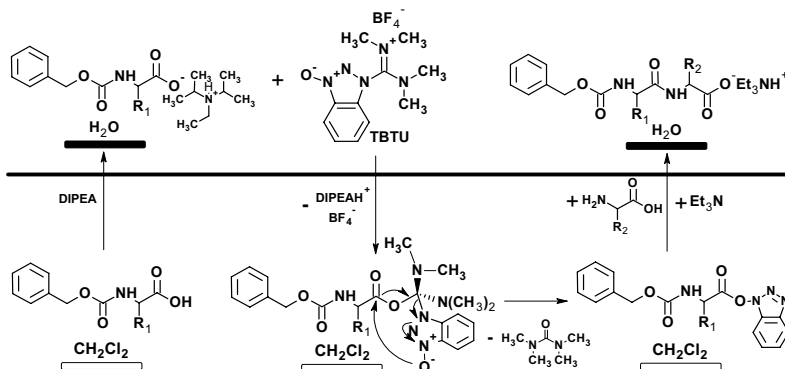
Синтезираните пептиди, получени по този начин са:

Z-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OMe
 Z-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-OMe
 Z-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OMe
 Ac-Glu-Met-Glu-Arg-Arg-NH₂
 Z-Asp-Phe-OMe
 Ser-Leu-Tyr-Asn-Thr-Val-Ala-Thr-Leu
 Asn-Leu-Val-Pro-Met-Val-Ala-Thr-Val
 Gly-Leu-Cys-Thr-Leu-Val-Ala-Met-Leu

Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OMe
 Boc-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-OMe
 Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OMe
 Boc-Asp-Phe-OMe
 Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-Leu-Ile-Pro-Arg
 Ile-Leu-Lys-Glu-Pro-Val-His-Gly-Val

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Всички реактиви и разтворители са закупени и използвани без последващо допълнително пречистване. Обърнато-фазовите HPLC-анализи са проведени на течен хроматограф "Waters", снабден с абсорбционен детектор модел 441 при дължина на вълната 280 nm и колона Nucleosil 100-5C₁₈ (12.5 cm x 4.6 mm) за аналитични цели. TLC анализите са проведени, използвайки силикагелни плаки за тънкослойна хроматография: **Merck F₂₅₄**, thin layer plates.

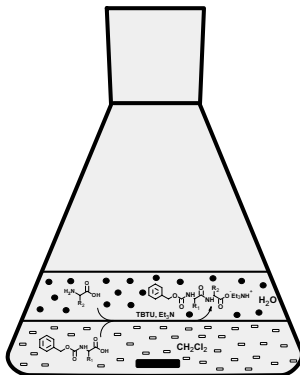


Фиг. 2. Фазово разпределение на реагентите в процеса на междофазов синтез на пептидна връзка[†]. Долният слой (фаза) е метилен хлоридния (дихлорметановия) слой, докато горният (горната фаза) е водния*.

Обща процедура за междофазов синтез на пептиди.

Към разтвор на 8-10 ммол (8-10 мола) от едната компонента (ацилна, N-защитена аминокиселина) в подходящия органичен разтворител (CH_2Cl_2 , CHCl_3 , етилацетат) се добавя водна фаза и реакционната смес се разбърква енергично на ледена баня. След това се добавят 8-10 ммол (8-10 мола) (1 еквивалент спрямо ацилната компонента) воден разтвор на DIPEA. Реакционната смес продължава енергично да се разбърква, и след 15 мин. се добавят 8-10 ммол (8-10 мола) (1 еквивалент спрямо ацилната компонента) TBTU. Отново след 15 мин., към реакционната смес се добавя разтвор 10-12 ммол (10-12 мола) на COOH -защитена или свободна аминокиселина (свободна аминокиселина или естерифицирана) (1.2-1.5 еквивалента спрямо ацилната компонента), както и 10-12 ммол (10-12 мола) триетиламин (1.2-1.5 еквивалента спрямо ацилната компонента). Реакцията протича при стайна температура за около 1-12 часа в зависимост от реагентите, както и условията на протичане на реакцията. След приключване на реакцията (TLC, HPLC) разтворът се поставя в делителна фуния. Във водния разтвор (полярния разтворител) попада реакционният продукт^o, както и тетраметил карбамидът, N, N-диизопропил N-етил амониевият тетрафлуорборат, както и хидроксibenзотриазолът и нереагираният излишък от аминокиселината. В органичния слой попада евентуално нереагираният ацилен компонент като активиран естер. Водният слой се промива с органичен неколkokратно. След това водната фаза се подкислява до pH 2-3 и се екстрахира няколко пъти с органичен разтворител. От своя страна комбинираният органичен разтвор (органичната фаза) се промива няколко пъти с наситен воден разтвор на NaCl. Във водния слой остават всички странични продукти на реакцията: тетраметил карбамидът, N, N-диизопропил N-етил амониевият тетрафлуорборат, както и хидроксibenзотриазолът и нереагираният излишък от аминокиселината. В органичния слой присъства само продуктът. Органичната фаза се суши с безводен сушител и се изпарява под вакуум. Прекристализира се из различни разтворители, в зависимост от вида и свойствата на продукта.

^o При използването на защитена аминокиселина (като аминокиселинен естер), продуктът на реакцията е разтворен в органичната фаза.



Фиг. 3. Фазово разпределение на реагентите при пептидния синтез в две взаимно несмесваеми течности (реакционни системи).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успешно е разработена процедурата за междофазов пептиден синтез, като тя е приложена за синтез на редица биологично-активни пептиди с утвърдено приложение и сравняване на характеристиките им. Методът може да намери успешно приложение за индустриални цели. В случаи, при които всички компоненти

на реакционната смес се разтварят при определени условия: температура, време, катализатор; във вода, се прилага методът за синтез в разтвор, който е в процес на разработване и усъвършенстване от автора, имащ от своя страна – поради изключително евтината си технология, огромно значение за индустрията.

ЛИТЕРАТУРА

- [1]. Emil Fischer "Synthese von Polypeptiden". Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1903, 36 (3), 2982-2992.
- [2]. E. Fischer, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1903, 36 (3), 2982-2992.
- [3]. Bergmann M. et al., Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1932, 66, 1288.
- [4]. M. Bergmann, L. Zervas, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1932, 65, 1192-1201.
- [5]. Bergmann M., Zervas L., Ross W., J. Biol. Chem., 1935, 111, 245.
- [6]. Paquet, A. Can. J. Chem., 1982, 60 (8), 976-980.
- [7]. Bodanszky, M.; Bodanszky, A. In: The Practice of Peptide Synthesis; Akademie-Verlag: Berlin, 1985.
- [8]. R. B. Merrifield. "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide". J. Am. Chem. Soc., 1963, 85 (14), 2149-2154.

За контакти:

Асистент д-р Станислав Георгиев Байрямов, катедра "Ремонт, надеждност и химични технологии", Аграрно-Индустриален Факултет, Русенски университет "Ангел Кънчев", Тел.: 082/ 888 581, 888 766, e-mail: sbayryamov@ru.acad.bg

Докладът е рецензиран.