

## Ултразвук-подпомогнат пептиден синтез

Станислав Байрямов

**Sonicator-assisted peptide synthesis:** *In this paper we describe the sonicator-assisted peptide synthesis of an immunomodulating dipeptide thymogen (Glu-Trp). The synthesis was carried out, using a variety of activating esters – to investigate the yields, purity and reaction time. The results describe that despite the absence of alkali catalyst, which allows the basic media, the products obtained by the reaction under neutral conditions were with high purity and yields, as well as they were prepared using short reaction times. This was due to the waves with specific wavelengths, creating by the sonicator, providing the appropriate conditions and energy for realizing of a condensation reaction. On the base of these conclusions, the sonicator-mediated peptide synthesis creates an attractive alternative for the preparation of products, necessary for pharmacy, medicine, cosmetics, as well as for nutrition industry.*

**Key words:** *Sonicator, Peptide Synthesis, Dipeptide, Activating Esters, Thymogen*

### ВЪВЕДЕНИЕ

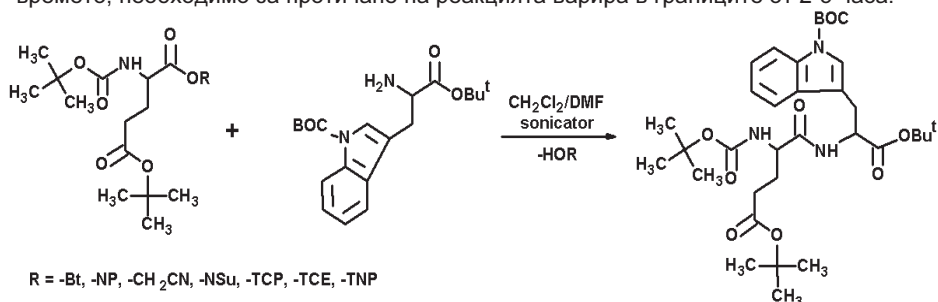
Пептидният синтез обхваща една обширна област от органичния синтез за производство на пептиди, намиращи най-разнообразно приложение в различни области на индустрията: медицината, фармацията, козметиката, хранително-вкусовата промишленост и др. Наред с класическия пептиден синтез в разтвор, въведен и разработен от Emil Fisher [1], както и твърдофазния пептиден синтез на Брус Мерифийлд [2, 3], намират приложение и други нестандартни методи и подходи за създаване на пептидна връзка: напр. микровълнов пептиден синтез [4], ball-milling пептиден синтез [5], пептиден синтез с използване на лигираща процедура [6] и др. Пептидният синтез, подпомогнат от ултразвук би създал достатъчни условия за осъществяване на кондензационна реакция, като от една страна би осигурил необходимата енергия за разкъсване на старите връзки и създаване на нови при нуклеофилната преестерификационна реакция, а от друга биха се създали необходимите условия за успешното разтваряне на трудноразтворимите изходни реактанти (когато е необходимо). Освен това ултразвук-подпомогнатият пептиден синтез осигурява меки и елегантни условия на протичане на реакцията, тъй като се изключва необходимостта от добавяне на алкален катализатор за ускоряване на реакцията, а синтезът се провежда в неутрална среда. С настоящата работа се представя възможността за реализиране на ултразвук-подпомогнат пептиден синтез, демонстрирайки всички предимства на този метод.

### ИЗЛОЖЕНИЕ

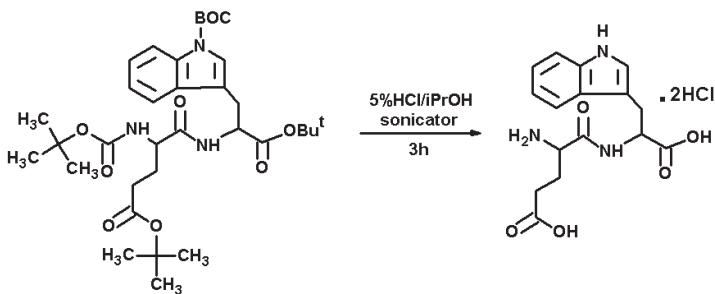
За разлика от DCC, DIC, TBTU, HBTU, TCTU, HCTU, TATU, NATU, PyBop, PyClor и др.[7], използвани като кондензиращи агенти в едностадийния синтез на пептидна връзка (кондензационен метод), методът на активираните естери позволява по-голяма селективност, както и по-меки условия за провеждане на реакцията [7]. Обикновено COOH-групите на аминокиселините са активирани под формата на хлориди, анхидриди, активирани естери. Хлоридите на аминокиселините, които често се използват за създаване на пептидна връзка са нестабилни, трудно се получават и имат ниски добиви. Освен това селективността на реагентите е ниска и съответно ниска е и чистотата на получените продукти. Ацилхлоридите са силно реакционноспособни, което води до нежелани странични реакции, особено при наличие на други нуклеофилни центрове (функционални групи: OH, COOH и др.), докато активираните естери са стабилни, лесно се получават, N-защитените аминокиселини под формата на активирани естери се вмъкват в меки условия, много са селективни и водят до високи добиви и чистота на получените продукти. Използването само на активирани естери в базични условия е трудно и понякога нежелателно – изисква доста време, а и реактивоспособността е

малка, както и добивите, изискват се по-сурови условия в сравнение с другите методи (понякога и нагряване). Също така, проблемът с метода на активираните естери, както и в кондензационния метод се заключава в ниските понякога добиви, дължащи се на трудността в разтварянето на даден изходен реактант. Прилагането на ултразвуковия подход позволява ускоряване на реакцията при метода на активираните естери, без да се намали селективността, а освен това увеличава добива на крайния продукт, поради подобряване на разтворимостта на реактантите.

Целевият продуктов обект, който беше избран за нашите изследвания е широко използваният като имуностимулант дипептид тимоген: Glu-Trp. С цел да се осигури протичане на целевата реакция и минимизиране на страничните, част от функционалните групи на изходните аминокиселини бяха предварително защитени [8, 9, 10]. За защита за  $\alpha$ -H<sub>2</sub>N-групата на L-Glu, както и за защита на азотния атом в индолното хетероциклено ядро на L-Trp беше избрана BOC-защитна група, въведена чрез реагента ди-трет-бутил пирокарбонат в слабо алкална среда [8]. За защита на  $\alpha$ -COOH-групата на L-Trp, както и на  $\chi$ -COOH-групата на L-Glu беше използвана Bu<sup>t</sup>-защита, въведена с помощта на изобутилен в трет-бутилов алкохол в кисела среда [9]. Освен това карбоксилната група на глутаминовата киселина беше активирана, за да се осъществи успешната кондензационна реакция. По този начин бяха синтезирани изходните реактанти, необходими за изследване на реакцията на синтез на тимоген. Реакцията за получаване на целевия дипептид беше проведена в среда от дихлорметан/диметилформамид при стайна температура (25<sup>o</sup>C), като времето, необходимо за протичане на реакцията варира в границите от 2-5 часа.



Фиг.1. Схема на кондензационната реакция на ултразвук-подпомогнат синтез на тимоген.



Фиг.2. Схема на деблокиране на защитните групи при ултразвук-подпомогнатия синтез на тимоген.

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

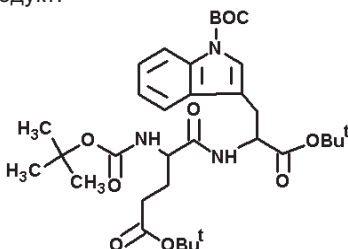
Обърнато-фазовите HPLC-анализи бяха извършени на течен хроматограф "Waters", снабден с абсорбиционен детектор модел 441 при дължина на вълната 280 nm и колона Nucleosil 100-5C<sub>18</sub> (12.5 cm x 4.6 mm) за аналитични цели.

<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектрите са снети и обработени на Bruker Avance II+ 600MHz spectrometer, използвайки BBO или TBI сондиране и изследване. Химичните отмествания са изразени в единици ppm и константите на спин-спиново взаимодействие са обозначени в Hz. Прецизните определяния на <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектрите бяха извършени чрез изчисляване на 2D хомоядрената корелация (COSY), DEPT-135 и 2D обърнатите (противоположните) детектирани хетероядрени (C-H) корелации (HSQC and HMBC).

TLC анализите бяха проведени с използване на силикагелни пластинки Kieselgel 60 F254, закупени от Merck, като за индикация на петната и визуална детекция бяха използвани 5% разтвор на H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в метанол или етанол, а също така алкохолен разтвор на нинхидрин, както и разтвор на фосфоро-молибденова киселина. За провеждане на TLC анализите бяха използвани следните системи от разтворители: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (9:1) или (9.5:0.5).

Крайните продукти бяха определени чрез елементарен анализ, използвайки автоматични анализатори: Carlo Erba Elemental Analyzer Model 1106 (Carlo Erba, Milan, Italy) и Perkin-Elmer Elemental Analyzer Model 240 (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Connecticut).

Синтез на Boc-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Trp(Boc)-OBu<sup>t</sup>: В ерленмайерова колба от 100 ml, към 0,01 мол Boc-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OR (R= -Bt, -NP, -CH<sub>2</sub>CN, -NSu, -TCP, -TCE, -TNP, -NMA) се добавят 0,012 мола Н-Trp(Boc)-OBu<sup>t</sup> в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF при стайна температура (25<sup>o</sup>C). Колбата се запушва с тапа и се поставя в ултразвуковата вана. Времето за протичане на кондензационната реакция варира в зависимост от вида на активирания естер (Табл. 1). След приключване на реакцията, към реакционната смес се добавя разтвор на калиева основа в изопропанол (1N KOH/i-PrOH) и колбата с реакционната смес се оставя на ултразвуковата вана за 1h с цел да се хидролизира и след това да се отстрани нереагиралият и излишен активиран естер. Колбата с реакционната смес се изважда от ултразвуковата вана и средата се разрежда с 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, след което органичната фаза се промива по 3 пъти с 0,5 N HCl, с 10 % NaHCO<sub>3</sub> и с наситен разтвор на NaCl. Суши се над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, филтрува се и разтворителят се изпарява под вакуум. Прекристализира се из етилов спирт. Получава се кристален продукт:

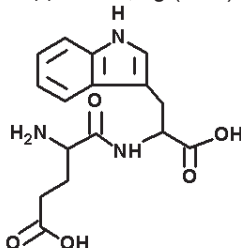


Boc-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Trp(Boc)-OBu<sup>t</sup>: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25<sup>o</sup>C): δ = 1.342 (s, 3H, COOBu<sup>t</sup>, Trp), 1.363 (s, 3H, Boc-N, Glu), 1.391 (s, 3H, γ-COOBu<sup>t</sup>, Glu), 1.659 (s, 3H, Boc-N (Ar), Trp), 1.921-2.001 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>, Glu), 2.081-2.149 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>, Glu), 3.131-3.289 (dd, 2H, β-CH<sub>2</sub>, Trp), 3.981-4.043 (t, 1H, α-CH, Glu), 5.089-5.123 (t, 1H, α-CH, Trp), 7.191-7.283 (t, 2H, 6-CH and 7-CH (Ar), Trp), 7.372-7.388 (d, 1H, 5-CH (Ar), Trp), 7.778 (s, 1H, 2-CH (Ar), Trp), 8.232-8.258 (d, 1H, 8-CH (Ar), Trp). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25<sup>o</sup>C): δ = 27.39 (β-CH<sub>2</sub>, Glu), 27.68 (γ-COOBu<sup>t</sup>, Glu), 27.86 (COOBu<sup>t</sup>,

Trp), 28.00 (BOC-N, Glu), 28.10 (BOC-N (Ar), Trp), 30.65 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Trp), 31.16 ( $\chi$ -CH<sub>2</sub>, Glu), 53.66 ( $\alpha$ -CH, Glu), 53.68 ( $\alpha$ -CH, Trp), 76.99 (C, BOC-N, Glu), 80.35 (C,  $\chi$ -COOBu<sup>t</sup>, Glu), 81.93 (C, COOBu<sup>t</sup>, Trp), 84.25 (C, BOC-N (Ar), Trp), 106.55 (3-C, (Ar), Trp), 113.74 (8-CH (Ar), Trp), 118.21 (7-CH (Ar), Trp), 118.52 (5-CH (Ar), Trp), 121.05 (6-CH (Ar), Trp), 121.77 (2-CH (Ar), Trp), 128.41 (4-C (Ar), Trp), 134.53 (9-C (Ar), Trp), 149.92 (OCO (BOC-N, (Ar)), Trp), 155.05 (OCO (BOC-N, Glu), 169.98 ( $\chi$ -COOBu<sup>t</sup>, Glu), 170.56 ( $\chi$ -COOBu<sup>t</sup>, Trp), 175.56 (CONH, Glu).

Elemental analysis: Anal. Calculated for C<sub>34</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>: (M<sub>w</sub> = 645.78 g/mol); C-63.24%, H-7.96%, N-6.51%; found: C-62.98%, H-7.85%, N-6.57%.

Синтез на тимоген (H-Glu-Trp-OH): Към 0,01 мол (6,46 g, M<sub>w</sub> = 645.78 g/mol) Вос-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Trp(Вос)-OBu<sup>t</sup>, се добавят 50-60 ml 5% HCl/i-PrOH в ерленмайерова колба от 100 ml. Колбата се поставя в ултразвуковата вана за 3h, след което разтворителят се изпарява и съизпарява с изопропанол. Получава се твърд продукт, който се прекристализира из ацетон. Добив: 3,2 g (96%).



Thymogen (H-Glu-Trp-OH): <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25°C):  $\delta$  = 1.761-1.958 (dq, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Glu), 2.473-2.531(dd, 2H,  $\chi$ -CH<sub>2</sub>, Glu), 3.252-3384 (dd, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Trp), 4.713-4.739 (t, 1H,  $\alpha$ -CH, Trp), 4.932-4.971 (t, 1H,  $\alpha$ -CH, Glu), 6.872 (s, 1H, 2-CH, (Ar), Trp), 7.043-7.112 (t, 2H, 6-CH and 7-CH, (Ar), Trp), 7.291-7.321 (d, 1H, 8-CH, (Ar), Trp), 7.473-7.502 (d, 1H, 5-CH, (Ar), Trp), 8.309 (s, broad, 6H, H<sub>2</sub>N (Glu), COOH (Glu), COOH (Trp), NH (Ar), (Trp), CONH). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25°C):  $\delta$  = 26.36 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Trp), 28.63 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>, Glu), 30.99 ( $\chi$ -CH<sub>2</sub>, Glu), 53.63 ( $\alpha$ -CH, Glu), 54.47 ( $\alpha$ -CH, Trp), 108.66 (3-C, Ar, Trp), 110.63 (8-CH, Ar, Trp), 118.67 (7-CH, Ar, Trp), 121.20 (5-CH, Ar, Trp), 122.86 (6-CH, Ar, Trp), 123.15 (2-CH, Ar, Trp), 128.68 (4-C, Ar, Trp), 136.86 (9-C, Ar, Trp), 171.44 (CONH, Glu), 173.66 (COOH, Trp), 178.68 (COOH, Glu).

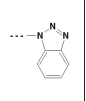
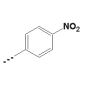

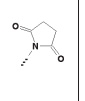
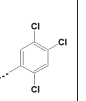
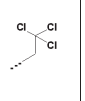
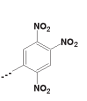
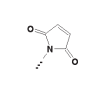
Elemental analysis: Anal. Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: (M<sub>w</sub> = 333.34 g/mol); C-57.65%, H-5.75%, N-12.61%; found: C-57.58%, H-5.56%, N-12.75%.

При провеждане на синтеза с помощта на ултравук бяха използвани различни активирани естери с цел – проучване на добива, чистотата и реакционното време за извършване на реакцията. Както е видно от данните в таблица 1, най-сполучливи резултати по отношение на добива дават сукцинимидният (R= -NSu) и бензотриазолиловият (R= -Bt) активирани естери на Вос-Glu(OBu<sup>t</sup>). След тях е 2,2,2-трихлоретиловият активирани естер (R= -TCE). От своя страна най-ниски добиви се постигат с използване на цианметиловия активирани естер (R= -CH<sub>2</sub>CN). По отношение на чистотата – с най-висока такава е продуктът, получен с използването на бензотриазолиловия (R= -Bt) и цианметиловия (R= -CH<sub>2</sub>CN) активирани естери, докато с най-ниска чистота е този, получен с помощта на 2,4,5-тринитрофенолиевия активирани естер (R=-TCP). Най-бързо реакцията протича при 2,4,5-трихлорфенолиевия естер, докато най-бавно реакцията тече с използването на сукцинимидния активирани естер (R= -NSu).

Резултатите показват, че въпреки отсъствието на алкален катализатор, създаващ базична среда, при неутрални условия реакцията тече достатъчно ефективно и с високи добиви, чистота и сравнително кратко време, благодарение на

ултразвуковите вълни, осигуряващи тези благоприятни условия и достатъчна енергия за осъществяване на кондензационната реакция. Нещо повече, в немалка част от случаите, за да се ускори реакцията, често се налага тя да бъде проведена при по-висока температура, т.е. необходимо е да се внесе допълнително количество енергия. При ултразвук-подпомогнатия синтез тази енергия се доставя от ултразвуковите вълни, благодарение на което реакцията тече при стайна температура. Освен това, поради трудността в разтворимостта на някои изходни реагенти, това довежда до понижаване на скоростта, намаляване на добивите на крайните продукти, както и би могло да доведе и до протичането на някои нежелани странични реакции. Ето защо, благодарение на ултразвук-подпомогнатия пептиден синтез се постига тази разтворимост както преди, така и в хода на самата кондензационна реакция.

Таблица 1: Добив, чистота и време на протичане на реакцията за получаване на тимоген (H-Glu-Trp-OH) чрез ултразвук, с използване на различни активирани естери на  $N^{\alpha}$ ,  $COOH^{\chi}$ -дизащитената глутаминова киселина.

Активирани естери								
Добив (%)	78	73	65	81	69	74	71	75
Чистота, HPLC (%)	97,2	94,4	96,5	93,7	93	91,6	90,3	94,2
Време (h)	3	4.5	4	5	2	2.5	3.5	3.5

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезът на тимоген с помощта на активирани естери на  $N^{\alpha}$ ,  $COOH^{\chi}$ -дизащитената глутаминова киселина и с използването на ултразвук позволява да се направят следните изводи:

1. Реакцията протича с високи добиви
2. Времето за протичане на реакцията е сравнително кратко
3. Създават се меки условия за протичане на реакцията
4. Чистотата на получените продукти е висока
5. Постига се селективност на реакцията

На базата на тези изводи, би могло да се констатира, че ултразвук-подпомогнатия пептиден синтез създава една привлекателна алтернатива за получаването на продукти, необходими за фармацията, медицината, козметиката, както и хранително-вкусовата промишленост. Нещо повече, благодарение на ултразвуковите вълни могат да се синтезират продукти, получени от трудноразтворими изходни реагенти, какъвто е случаят с дипептида тимоген, получен от глутаминова киселина и триптофан.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] A. Fischer, E.; Otto, E. Ber., 36, 2106, 1903; B. Fischer, E. Ber. 36, 2982, 1903.
- [2] Merrifield, B. Chem. Scripta, 25, 121-131, 1985.

[3] Stewart, J.M., Young, J.D., In: Solid phase peptide synthesis, Second edition, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA, 1984.

[4] A. Erdélyi, M., Gogoll, A. Synthesis, No. 11, 1592–1596, 2002. B. Abu-Baker, S., Garber, P., Hina, B., Reed, T., Shahrokh, G., Al-Saghir, M., Lorigan, G. Open Journal of Synthesis Theory and Applications, 3, 1-4, 2014.

[5] A. Krasimira Zamfirova, Stanislav Bayramov. Научни трудове на Русенски университет-2011, том 50, 2011, серия 9.1, 65 – 71

[6] A.Canne, L. E., Botti, P., Simon, R. J., Yijun Chen, Dennis, E. A. and Kent, S. B. H. J. Am. Chem. Soc., 121, 8720-8727, 1999; B. Nilsson, B. L., Kiessling, L. L. and Raines, R. T. Org. Lett., Vol. 3, No. 1, 2001

[7] Gross, E., Meienhofer, J., Johnes, G., Bodanszky, M., Reach, D., Singh, J., Kemp, In: The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol.1: Major Methods of Peptide Bond Formation, Academic press, New York, 1979.

[8] Bodanszky, M., Bodanszky, A. In: The Practice of Peptide Synthesis, Akademie-Verlag: Berlin, 1985.

[9] Gershkovich, A. A.; Kibirev, V. K. Sintez peptidov. Reagentyi i metody. Izdatel'stvo: "Naukova Dumka", Kiev, 1987. (Гершкович, А. А., Кибирев, В. К., Синтез пептидов. Реагенты и методы, Издательство: „Наукова думка“, Киев, 1987.)

[10] Gross, E., Meienhofer, J., Johnes, G., Bodanszky, M., Reach, D., Singh, J., Kemp, In: The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol.3: Protection of Functional Groups in Peptide Synthesis, Academic press, New York, 1981.

**За контакти:**

Гл. ас. д-р Станислав Георгиев Байрямов, Катедра РНММЛХТ: Направление „Химия“, Русенски университет “Ангел Кънчев”, тел.: 082-888 228, 082-888 459, e-mail: sbayramov@uni-ruse.bg

**Докладът е рецензиран**