

Задача 36. Твердофазный синтез пептида

А. Введение

Твердофазный синтез пептидов предложен Р. Б. Меррифилдом из университета Рокфеллера (Нобелевская премия 1984 г.) Этот метод основан на сборке пептида на нерастворимой полимерной подложке последовательным присоединением остатков аминокислот с защищенными α -амино- и боковыми группами. Полимерная смола на основе 2-хлортритилхлорида, использовать которую впервые предложил К. Барлос, неустойчива к действию кислот. Пространственное строение полимерной смолы, равно как и умеренная кислотность, необходимая для разрыва связей в цепях, делают смолу полезной для множества применений. Для N- α -защиты аминокислот используют Fmoc-группу, неустойчивую к действию оснований. После удаления этой защитной группы следующую защищенную аминокислоту добавляют с использованием или связывающего реагента, или предварительно активированного защищенного производного аминокислоты. Конечный пептид присоединен к полимерной матрице через свою C-терминальную группу, причем связь с полимером можно расщепить, получив пептидокислоту или амид (в зависимости от использованного связывающего реагента). Часто для защиты боковых цепей выбирают такие группы, расщепление которых проходит одновременно с отрывом пептида от полимерной матрицы.

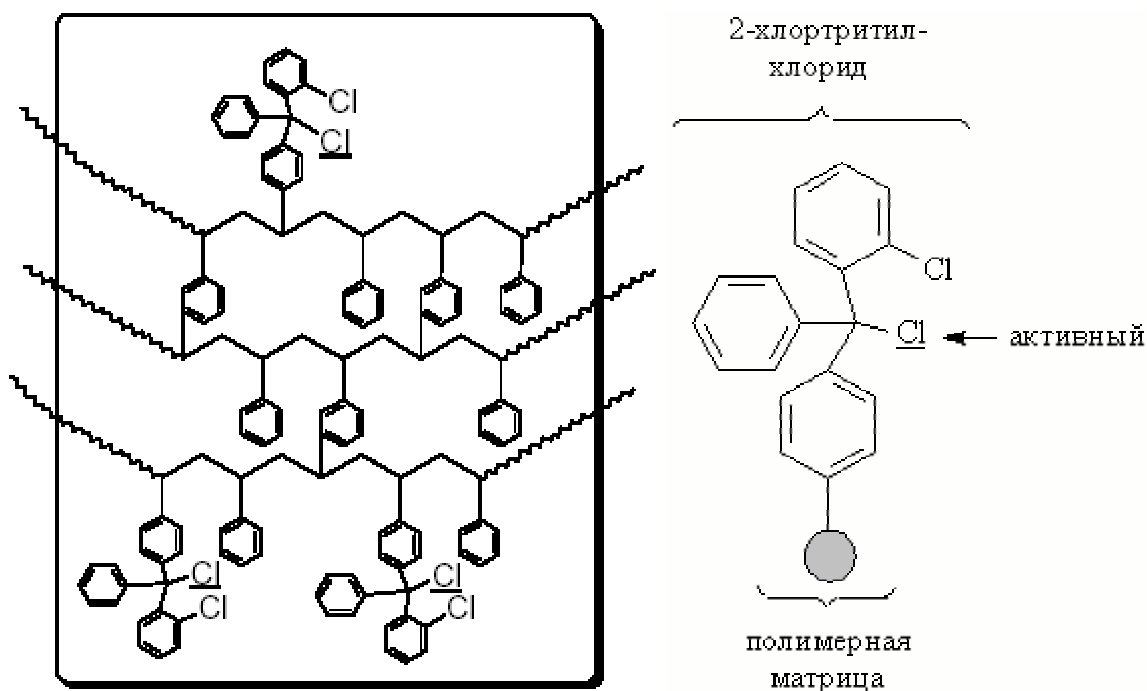


Рис. 1. 2-Хлортритилхлорид, присоединенный к полимерному носителю – полистиролу, шитому добавкой 1% дивинилбензола.

Б. Синтез дипептида $H_2N-Ser-Ala-OH$

Синтез указанного дипептида проводят, следуя Fmoc-стратегии, с использованием 2-хлортритилхлоридного полимера в качестве твердого носителя. Происходящие реакции иллюстрирует рис. 2.

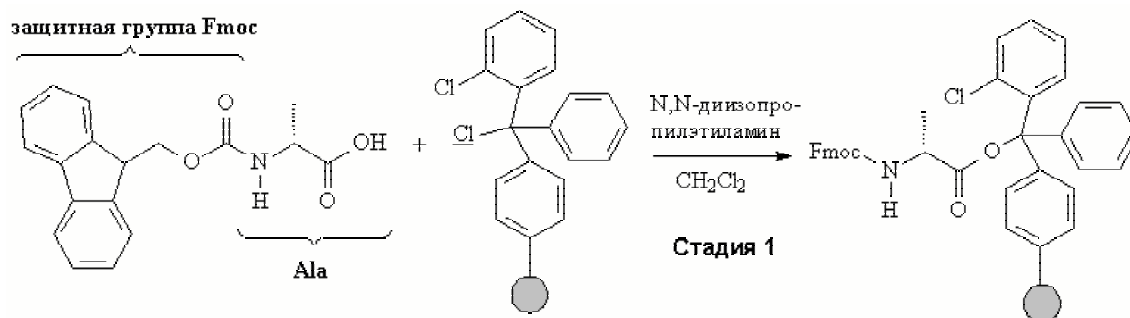


Рис. 2а. Синтез H_2N -SER-ALA-OH с использованием Fmoc-стратегии на полимере с 2-хлортритилхлоридом в качестве твердого носителя (стадия 1).

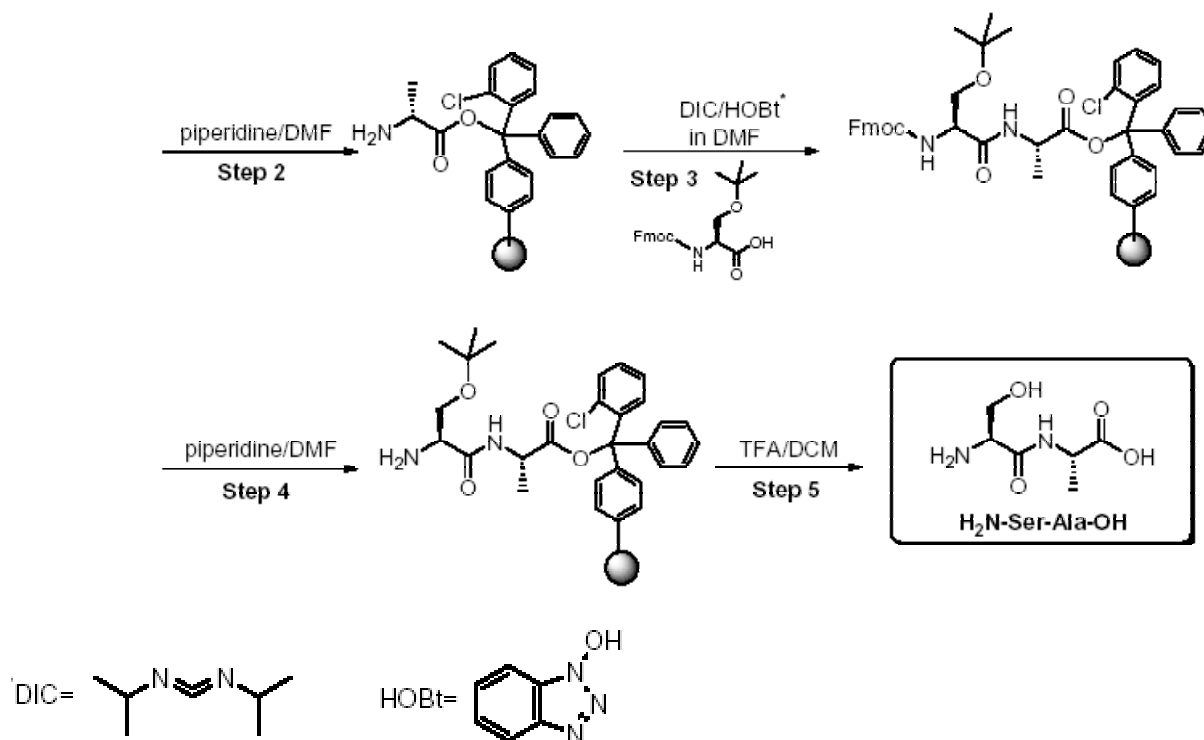


Рис. 2б. Синтез H_2N -SER-ALA-OH с использованием Fmoc-стратегии на полимере с 2-хлортритилхлоридом в качестве твердого носителя (стадии 2-5).

В. Оценка степени присоединения первого остатка

Эти действия выполняют после 1-ой стадии.

1. Возьмите УФ кювету.
2. Отвесьте в нее 2 мг сухого полимера с привитой Fmoc-аминокислотой. Перенесите в кювету 3 cm^3 свежеприготовленной смеси 20% водного раствора пиперидина с ДМФ.
3. Используя пипетку Пастера, перемешивайте смесь 2-3 минуты.
4. Поместите ячейку в спектрофотометр. Измерьте светопоглощение (A_{sample}) при 290 нм.
5. Используя другую УФ кювету, измерьте светопоглощение смеси 20% водного раствора пиперидина с ДМФ (3 cm^3) при той же длине волны (A_{blank})
6. По уравнению

$$\text{Степень присоединения} = \frac{n}{m} = \frac{A_{sample} - A_{blank}}{1.75m}$$

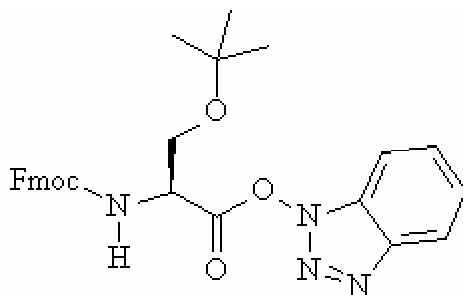
где n – количество вещества Fmoc-аминокислоты (в ммоль), закрепленной на полимере, m – масса полимера (г), оцените степень присоединения первого остатка.

Г. Экспериментальная часть

Стадия 1. Растворить Fmoc-Ala-OH (62 мг, 0.2 ммоль) в сухом CH_2Cl_2 (2 см^3) и добавить DIPEA (N,N-диизопропилэтиламин) (139 мкл, 0.8 ммоль). Перенести этот раствор в специальный сосуд из пористого стекла для проведения твердофазного синтеза пептидов в неавтоматическом режиме, в который предварительно поместили смесь полимера, модифицированного 2-хлортритилхлоридом (200 мг, 0.2 ммоль; содержание Cl 1.0 ммоль /г полимера), и $1 \text{ см}^3 \text{ CH}_2\text{Cl}_2$. Встряхивать в течение 30 минут и отфильтровать. Для эндкеппинга всех остающихся реакционноспособных тритильных групп добавить 0.2 см^3 метанола квалификации «для ВЭЖХ» и перемешивать 15 минут. Отфильтровать полимер, промыть его трижды порциями по $2 \text{ см}^3 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{DIPEA}=17/2/1$, трижды – порциями по $2 \text{ см}^3 \text{ CH}_2\text{Cl}_2$ и высушить полимер в эксикаторе над КОН.

Стадия 2. По методике, описанной выше, оценить степень присоединения первого остатка. Используя 3 см^3 свежеприготовленной смеси 20% водного раствора пиперидина с ДМФ, удалить Fmoc-защитную группу. Через 5 мин отфильтровать смолу и повторить промывку 3 см^3 указанной смеси. Промыть полимерную смолу ДМФ (трижды по 2 см^3) и CH_2Cl_2 (трижды по 2 см^3).

Стадия 3. Растворить Fmoc-Ser(O-t-Bu)-OH (383 мг, 1 ммоль) и HOBT (135 мг, 1 ммоль) в минимальном объеме ДМФ. После этого добавить по каплям DIC (156 мкл, 1 ммоль) и взбалтывать смесь в течение 20 минут. Это приводит к образованию активного сложного эфира с изображенной ниже структурой:



Добавить этот раствор к полимерной смоле, набухшей в 1 см^3 ДМФ. Потихоньку взбалтывать на протяжении 1 часа, затем отфильтровать, промыть ДМФ (трижды по 2 см^3) и CH_2Cl_2 (трижды по 2 см^3). Затем, чтобы убедиться в завершении реакции, выполнить пробу Кайзера (описана ниже).

Проба Кайзера:

Приготовить следующие растворы:

1. Растворить 5 г нингидрина в 100 см^3 EtOH.
2. Растворить 80 г расплавленного фенола в 20 см^3 EtOH.
3. Добавить 2 см^3 0.001 М водного раствора KCN к 98 см^3 пиридина.
4. Перенести несколько зерен полимера в маленькую стеклянную пробирку и добавить по 2 капли каждого из приготовленных растворов.
5. Хорошо перемешать и нагревать на кипящей водяной бане в течение 5 минут. Положительная проба (синее окрашивание зерен полимера) означает, что стадию присоединения следует повторить (до получения отрицательной пробы Кайзера).

Стадия 4. Удаление Fmoc-защитной группы выполняется по методике, описанной на стадии 2.

Стадия 5. Промыть полимерную смолу изопропанолом и эфиром (трижды по 2 см^3) и высушить

ее до воздушно-сухого состояния под вакуумом в течение 10 минут. Добавить к сухому полимеру расщепляющий реагент (3 см³ 0.5% TFA/CH₂Cl₂) и оставить на полтора часа, не забывая время от времени перемешивать. Собрать фильтрат и промыть полимерную смолу расщепляющим реагентом (трижды по 2 см³). Выпарить собранные вместе порции фильтрата досуха. Добавить холодный эфир (5 см³) и перемешать твердый осадок шпателем. Оставить на 10 минут, декантировать жидкость над осадком. Повторить те же действия с 5 см³ эфира. Продукт H₂N-Ser-Ala-OH получают фильтрованием через воронку из пористого стекла.

Вопросы – отчет

а. Запишите следующие данные:

I. Масса вашего продукта: 8 мг

II. Рассчитанный теоретический выход: 12.3 мг
(для степени присоединения первого остатка 0.35)

III. Полученный выход в процентах от теоретического: 65%

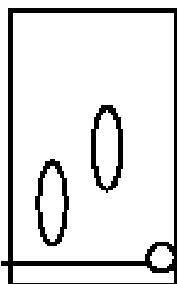
IV. Температура плавления продукта: 210-213°C

б. Перерисуйте пластинку для тонкослойной хроматографии следующих веществ (при использовании в качестве элюента смеси CHCl₃/MeOH=9/1)

i) Fmoc-Ala-OH,

ii) Fmoc-Ser(O-t-Bu)-OH,

iii) H₂N-Ser-Ala-OH



в. Оцените R_f указанных выше продуктов: i) 0.25, ii) 0.40, iii) 0.

г. По данным поляриметрических измерений запишите наблюдаемое значение угла вращения α и удельное вращение вашего продукта $[\alpha]_D^t$. Расчеты выполняйте по уравнению:

$$[\alpha]_D^t = \frac{\alpha}{lc}$$

где t – температура (25 °C), D обозначает спектральную линию натрия (589.0 нм), $l = 1$ дм, $c = 6$ г/100 см³ водного раствора HCl.

Ответ: $\alpha = 1.91^\circ$, $[\alpha]_D^t = -31.8^\circ \text{ дм}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^3$.