

УДК 547.466:542.95(075.5)

Базовые приемы работы на твердой фазе: от азбуки пептидного синтеза к библиотекам неприродных аминокислот

Е. В. Бабаев, Д. С. Ермолатьев

ЕВГЕНИЙ ВЕНИАМИНОВИЧ БАБАЕВ — доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории органического синтеза Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: органическая химия, химия гетероциклов, комбинаторная химия.

ДЕНИС СЕМЕНОВИЧ ЕРМОЛАТЬЕВ — кандидат химических наук (Ph.D.). Католический университет Лувена (Catholic University of Leuven, Бельгия), лаборатория органической и микроволновой химии. Область научных интересов: твердофазный и микроволновый синтез, химия гетероциклов.

119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, МГУ, Химфак, тел. (495)939-30-20, E-mail babaev@org.chem.msu.ru

Введение

Предлагаемая публикация имеет не совсем обычную структуру. Основанная на экспериментах для отработки учебной задачи студенческого спецпрактикума по комбинаторной химии в МГУ, она сочетает элементы обзора (тщательно отобранные из литературы по пептидному синтезу приемы работы), пошаговые указания экспериментально-методического характера (в виде проверенных авторами методик) и собственно научное исследование — получение ранее недоступного семейства неприродных аминокислот с отчетливым структурным мотивом лекарственных препаратов. По своей химической сути выбранная последовательность реакций представляет собой классическую (хотя и несколько сокращенную) схему пептидного синтеза:

- 1) иммобилизация N-замещенной аминокислоты на твердофазную подложку;
- 2) снятие защитной группы;
- 3) модификация NH₂-группы аминокислоты;
- 4) удаление модифицированной аминокислоты с подложки.

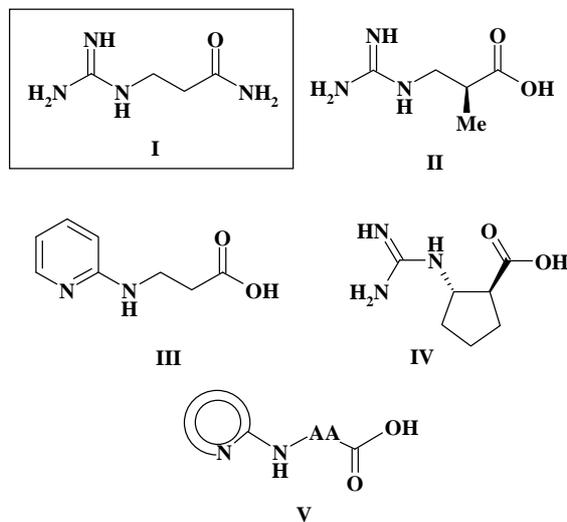
Оригинальным элементом задачи, ее своеобразной «изюминкой», является последняя стадия, где для модификации аминокислоты используется гетарилирование — достаточно редкая реакция для получения неприродных аминокислот [1, 2].

Сначала нами дается обоснование, почему структуры молекул в полученной библиотеке могут быть биологически активными. Затем анализируются особенности проведения каждой из четырех стадий с точки зрения методологии и отработанных в литературе методов. В заключении даются конкретные практические рекомендации и методики по проведению работы, а также доказательства строения и чистоты получаемых веществ. Главная методическая особенность работы — практиче-

ски полное отсутствие специализированного оборудования, что позволяет выполнять ее в обычных студенческих практикумах.

Постановка задачи

В настоящее время биологическая активность 3-гуанидинилпропионовой кислоты вызывает интерес среди медицинских химиков по причине выраженной антидиабетической активности этого соединения и, одновременно, его метаболической неустойчивости в организме человека. Из применяемых в медицинской практике лекарств наиболее известен препарат Тиформин® I, который является простым амидом 3-гуанидинилпропионовой кислоты. В работах [3, 4] по оптимизации структуры и поиску более активных аналогов 3-гуанидинилпропионовой кислоты были синтезированы и испытаны на биологическую активность серии ее гомологов и биоизостеров:



Было показано, что активность главным образом связана с наличием амидинового фрагмента 3-гуанидинпропионовой кислоты, в то время как точечные мутации и простые замещения фрагмента гуанидина приводили к частичной или полной потере активности. Напротив, авторами отмечено, что α -алкилирование **II**, замыкание в гетероцикламидинового или гуанидинового фрагментов **III**, а также увеличение конформационной жесткости алкильной цепи **IV** в ряде случаев усиливало антигипергликемическую активность. Из этих результатов следует, что одним из направлений модификации структуры 3-гуанидинпропионовой кислоты мог бы являться систематический перебор гетероциклов, заменяющих фрагмент гуанидина, а также биоизомерическая замена карбоксильной группы при широком варьировании структуры алкильной цепи. Таким образом, можно поставить задачу разработки путей синтеза широкой серии аминокислот гетероциклического ряда, объединенных общей формулой **V**, включающей гуанидиновый или амидиновый фрагмент в состав α -аминогетероцикла и остаток аминокислоты (AA). Данный класс соединений широко представлен в литературе, однако, несмотря на актуальность проблемы получения N-гетариламино кислот, до сих пор отсутствует универсальный метод их синтеза. Анализ литературы показал, что наиболее важными методами получения таких N-гетариламино кислот является N-алкилирование α -аминогетероциклов и реакция нуклеофильного замещения в гетероциклическом ядре производными аминокислот.

Сравнивая эти методы, следует учесть, что аминокислоты и их защищенные производные коммерчески доступны, а следовательно, более целесообразным подходом для синтеза широкого ряда гетариламино кислот является второй метод. Этот подход использует производные аминокислот и требует проведения реакции ароматического нуклеофильного замещения в гетероциклах, содержащих хорошую уходящую группу в α -положении. Хорошо известно, однако, что применение свободных аминокислот осложнено протекающими побочными процессами с их участием, поэтому необходимо вводить в реакции предварительно защищенные производные аминокислот, а также свести к минимуму взаимодействие между молекулами аминокислоты.

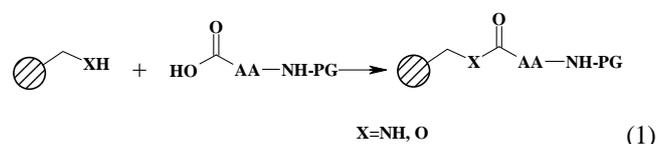
Ключевым решением проблемы синтеза целого ряда производных **V** по единой стратегии мог бы служить твердофазный синтез. Как известно, твердофазный подход к синтезу позволяет, с одной стороны, блокировать карбоксильную функцию аминокислоты через образование сложноэфирной или амидной связи с полимерной подложкой, а также исключить взаимодействие молекул аминокислоты между собой с образованием дикетопиперазинов и олигопептидов. С другой стороны, применение полимерного носителя позволяет получить как свободные кислоты, так и сложные эфиры и амиды, что значительно расширяет возможности метода.

В результате, наиболее приемлемым кажется подход, основанный на реакции ароматического нуклеофильно-

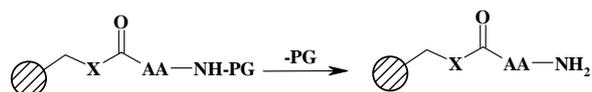
го замещения в гетероциклах под действием аминокислот, иммобилизованных на полимерной подложке. (Эту реакцию можно в равной степени трактовать и как N-гетарилирование аминокислот.) В качестве гетероциклов для гетарилирования были выбраны 2-галогенпроизводные пиримидина, 5-нитропиримидина и 5-нитротиазола. Все эти галогенпроизводные достаточно легко реагируют с первичными и вторичными алифатическими аминами, результаты детально изучены и представлены в литературе.

Таким образом, выбранная стратегия синтеза N-гетариламино кислот может быть представлена следующей схемой (здесь и далее AA — фрагмент аминокислоты, PG — защитная группа).

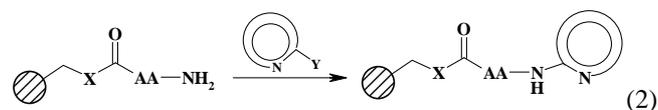
Стадия 1. Иммобилизация N-защищенной аминокислоты на полимерный носитель:



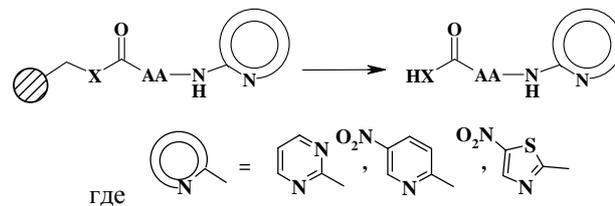
Стадия 2. Деблокирование аминокислоты:



Стадия 3. Нуклеофильное замещение в гетероцикле:



Стадия 4. Снятие продукта с полимерного носителя:



Твердофазный органический синтез

Методология современного твердофазного органического синтеза во многом заимствована из твердофазного синтеза пептидов, однако в отечественной литературе содержится очень мало информации об особенностях твердофазного органического синтеза и о его преимуществах перед традиционным жидкофазным синтезом. Поэтому уместно дать краткую характеристику методу и применяемым в твердофазном синтезе полимерным носителям [5].

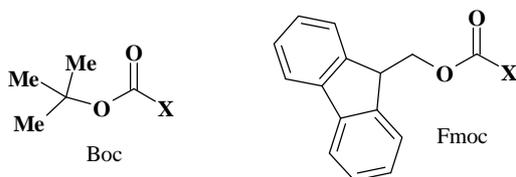
Твердофазный органический синтез призван ускорить процесс синтеза веществ за счет упрощения выделения и исключения дополнительной очистки, как промежуточных соединений, так и целевых веществ. Термин *твердофазный (solid-phase)* относится скорее к физическим характеристикам вещества на носителе, так как химическая реакция на полимерном носителе проте-

вированным к замещению гетероциклом. Рассмотрим подробнее методологический аспект получения иммобилизованных аминокислот на полимерных носителях.

Стадия 1. Иммобилизация N-защищенной аминокислоты на полимерный носитель

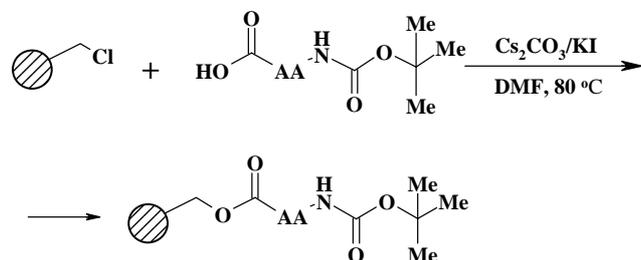
Первой стадией нашей схемы является иммобилизация аминокислоты на полимерный носитель (см. уравнение (1)). Для того чтобы избежать таких побочных процессов, как образование олигопептидов, аминокислоту предварительно защищают. Как правило, используют N-защищенные аминокислоты, и образующая связь между аминокислотой и носителем является связью амидного или сложноэфирного типа.

Наиболее часто применяемыми защитами аминогруппы в твердофазном органическом синтезе являются защитные группы карбаматного типа *трет*-бутоксикарбонильная (Boc) [6] и 9H-флуоренилметоксикарбонильная защита (Fmoc) [7], X — защищаемая группа:



Необходимо отметить, что выбор защитной группы определяется используемым типом полимерного носителя. Условия иммобилизации защищенных аминокислот различны для различных типов полимерных носителей.

Иммобилизация Boc-аминокислот на смолу Меррифилда, представляющую собой хлорметиловый полистирол, проводится *in situ* в виде цезиевых солей при добавлении суспензии карбоната цезия в диметилфталате (DMF) и каталитических количествах йодида калия. Избыток реагентов по отношению к количеству носителя выбирается в каждом случае индивидуально и составляет 1,5—4 эквивалента.



Иммобилизация Fmoc-аминокислот на полимерный носитель Ванга (X=O) с образованием сложноэфирного линкера бензильного типа осуществляется карбодимидным методом при помощи диизопропилкарбодимида (DIC) в присутствии 4-(диметиламино)пиперидина (DMAP) в качестве катализатора. Реакция иммобилизации со стерически незатрудненными аминокислотами

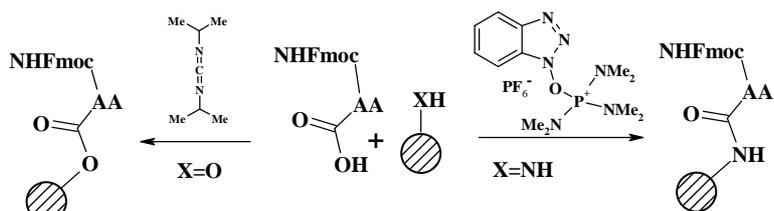


Схема 1

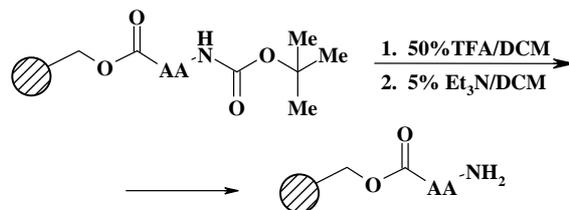
протекает при комнатной температуре. Иммобилизация стерически затрудненных аминокислот требует проведения реакции при 40—60 °С в течение 2-х дней и повторного проведения иммобилизации (схема 1).

Иммобилизация Fmoc-аминокислот на полимерный носитель Ринка (X=NH) с образованием амидного линкера бензгидрильного типа осуществляется в присутствии реагента Кастро — (1H-1,2,3-бензотриазол-1-илокси)трис-(диметиламино)фосфония гексафторфосфата (BOP), основания диизопропилэтиламина (DIEA) и 1-гидроксибензотриазола (HOBT) в качестве катализатора. Реакция протекает при комнатной температуре в течение 2 ч для стерически незатрудненных и 4—6 ч в случае стерически затрудненных аминокислот.

Стадия 2. Деблокирование защищенной аминокислоты на полимерном носителе

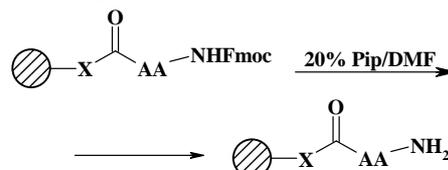
На второй планируемой нами стадии (после иммобилизации защищенной аминокислоты) требуется снять защитную группу для активации аминогруппы. Способы снятия Boc- и Fmoc-защиты различны.

Удаление Boc-защиты аминокислот на смоле Меррифилда проводится 50%-ной трифторуксусной кислотой в дихлорметане в течение получаса, в этих условиях линкер Меррифилда остается неповрежденным.



После снятия защиты смолу промывают раствором триэтиламина для удаления трифторуксусной кислоты.

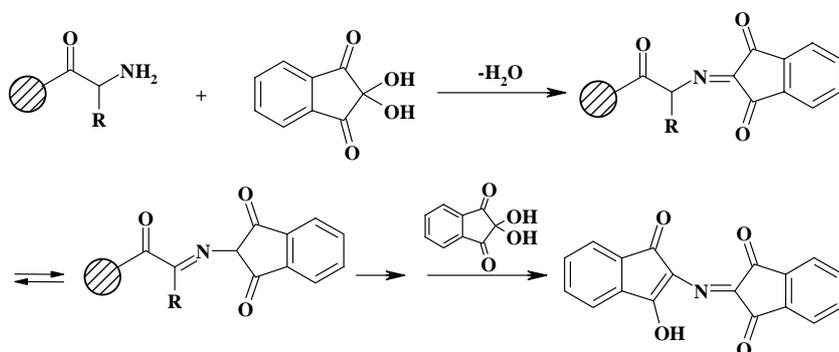
Удаление Fmoc-защиты аминокислот на носителе Ванга (X=O) и Ринка (X=NH) проводится 20%-ным раствором пиперидина в DMF течение 40—50 мин.



Значительное уменьшение массы смолы после снятия Fmoc-защиты может служить основой для гравиметрического определения степени иммобилизации защищенных аминокислот на первой стадии твердофазного синтеза.

Рекомендуется проводить последовательную обработку смолы раствором пиперидина в диметилфталате — сначала в течение 5—10 мин, затем 30 мин в свежем растворе. После снятия защиты смолу промывают не менее 4-х раз диметилфталатом для отмывки от продуктов разрушения Fmoc-защиты. Контроль за протеканием реакции ацилирования на носителе или удаление защитной функции с аминогруппы возможен с помощью теста Кайзера.

Тест Кайзера на аминогруппу. Анализ смолы после реакции, в результате которой исчезает, либо появляется свободная аминогруппа, легко осуществляется при помощи нингидринового теста Кайзера [8]. Этот метод может быть как качественным, так и количественным, и представляет собой достаточно чувствительную цветовую реакцию на аминогруппу.



Глубокая темно-синяя окраска смолы и раствора отчетливо свидетельствуют о присутствии на смоле первичной аминной функции. Если же цвет остается желтым, то аминная функция на смоле отсутствует. В случае вторичных аминов (пролин) или пространственно затрудненных (фенилаланин и β-фенилаланин) смола и раствор окрашиваются в характерный в таких случаях темно-красный цвет.

Стадия 3. Нуклеофильное замещение в гетероциклах с участием иммобилизованной на носителе аминокислоты

Следующим этапом, запланированным нами для практической реализации, является проведение реакции ароматического нуклеофильного замещения; нуклеофилом служит привитая аминокислота, а активированный гетероцикл находится в растворе (см. уравнение (2)). Большинство реакций нуклеофильного замещения на

Таблица 1

Скорость реакции галогенопиримидина с пиперидином в этаноле

Пиримидин	Относительные константы реакций [9]		
	20 °C	30 °C	40 °C
2-Br	1	2,05	4,1
2-Cl	0,49	1,03	2,11
2-F	66,23	117,7	236
2-I	0,3	0,64	1,35

Таблица 2

Относительные константы нуклеофильного замещения в активированных пиримидинах под действием циклогексиламина (29 °C, EtOH)

Пиримидин	Относительная константа [10]
2-Cl	1
2-MeSO-	2,2
2-MeSO ₂ -	4,7
4-MeSO-	1,1·10 ³
4-MeSO ₂ -	6,7·10 ³
2-PhSO ₂ -	4,5

носителях по выполнению не отличаются от реакций в жидкой фазе. Следует, однако, иметь в виду, что температура процесса не должна превышать 120 °C, выше которой начинает разрушаться полистирольная основа носителя. В условиях проводимой на носителе реакции линкер также должен сохраняться.

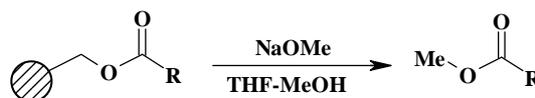
Выбирая подходящие активированные гетероциклические субстраты, следует учитывать природу уходящей группы в гетероцикле. В таблицах 1 и 2 приведена активность пиримидинов с разными уходящими группы в поло-

жениях 2 и 4.

Из таблиц 1, 2 следует, что скорость замещения в 2-галогенпиримидинах наивысшая для фторпроизводного, положение 4 более активно, чем 2, а сульфонильные группы более предпочтительны, чем атом хлора. Приведенные данные полезны и для подбора других гетарилирующих субстратов.

Стадия 4. Снятие целевого соединения с полимерных носителей [11]

Большинство линкеров при твердофазном органическом синтезе расщепляются в кислой среде. Устойчивость линкеров к кислоте резко понижается при переходе от смолы Меррифилда к смоле Ванга и Ринка. Линкер Ринка расщепляется в более мягких условиях (10—20% CF₃COOH), чем линкер Ванга (50% CF₃COOH). Смола Меррифилда в этих условиях пассивна, и для ее расщепления используют переэтерификацию в растворе NaOMe/MeOH, приводящую к образованию эфира кислоты [12].



Еще раз напомним, что природа линкера определяет тип терминальной функции в образующейся молекуле, удаляемой с подложки. Смола Ванга позволяет получать кислоты, а смола Ринка — амиды.

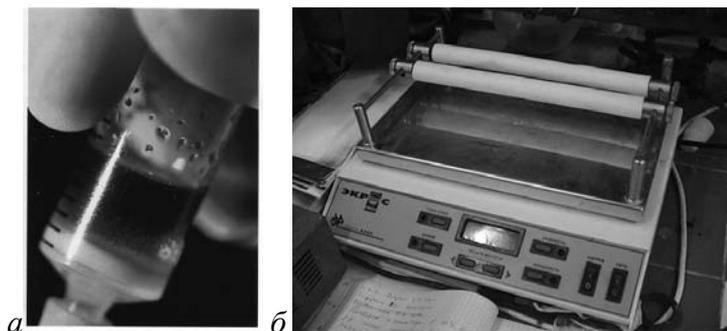


Рис.2. Оборудование для проведения твердофазного синтеза:

a — пластиковый шприц с пористой перегородкой, *б* — термостатируемый шейкер

Оборудование и материалы

Для экспериментального осуществления указанной 4-стадийной последовательности не требуется специфического лабораторного оборудования. Реакции, не требующие нагревания, удобно проводить во флаконах с крышкой или в пластиковых шприцах с пористой перегородкой (рис. 2*a*), сокращая манипуляции на стадии фильтрования и промывки смол. Если требуется нагревание, то стеклянные флаконы (желательно, из термостойкого стекла и с винтовыми герметичными крышками) можно закрепить на термостатируемом шейкере (использованный нами недорогой отечественный вариант приведен на рис. 2*б*).

Набор реактивов включает три базовых компонента: «школьный» набор аминокислот, смолу Меррифилда и/или Ринка, простые замещенные гетероциклы (см. ниже). Можно сразу использовать каталожные иммобилизованные аминокислоты. В нашем же случае (с учетом стадий защиты/иммобилизации аминокислот) потребовались такие реагенты, как ди-*трет*-бутилдикарбонат и 9-флуоренил-метилхлорформиат (постановка Вос- и Fmoc-защит) и реагенты для иммобилизации — $\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{KI}$ или НОВт или ВОР. Для теста Кайзера нужен нингидрин, для удаления защитных групп — CF_3COOH и пиперидин. На некоторых стадиях брался DIEA. Следует учитывать большой расход растворителей — диметилформамида и хлористого метилена (DCM) для тщательной промывки смол.

Практическое выполнение задачи

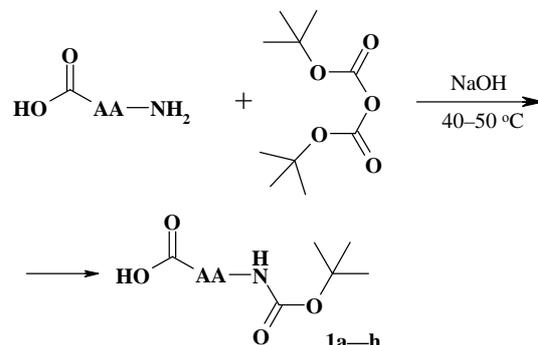
Реализация стадии 1.

Иммобилизация аминокислот на подложку

Исходными веществами для стадии 1 являются N-защищенные аминокислоты. Вос- и Fmoc-аминокислоты коммерчески доступные, но достаточно дорогие препараты. По этой причине представлялось разумным вводить указанные защитные группы, используя выбранный круг аминокислот.

Методика получения Вос-аминокислот 1. Вос-защиту вводят нагреванием аминокислот и ди-*трет*-

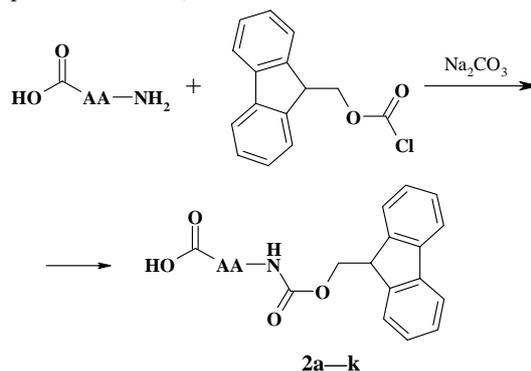
бутилдикарбоната в водном диоксане в присутствии гидроксида натрия [13].



К раствору 1,6 г гидроксида натрия (0,04 моль) в 40 мл воды прибавляли 0,04 моль аминокислоты, встряхивая раствор в течение 10 мин. К охлажденной до 10 °С смеси в течение 15 мин приливали раствор 6,55 г (0,03 моль) ди-*трет*-бутилдикарбоната в 30 мл диоксана. Через 20 мин раствор осторожно нагревали до 40—60 °С (начинается выделение CO_2) и перемешивали в течение 16—40 ч до исчезновения ди-*трет*-бутилдикарбоната по ТСХ. Реакционную смесь выливали в 100 мл ледяной воды, pH раствора доводили до 3, добавляя небольшими порциями 10%-ную HCl. После экстрагирования хлороформом (2×100 мл) органические фазы объединяли и отгоняли растворитель на роторном испарителе. Образующее бесцветное масло закристаллизовывали растиранием в гексане на ультразвуковой бане. Вещества высушивали в вакуумном шкафу; при необходимости очищали перекристаллизацией из системы гексан/этилацетат. Контроль по ТСХ: хлороформ-метанол-уксусная кислота 9:1:0,1.

Таким путем были получены 8 соединений **1a-h**: Вос-глицин, Вос-L-аланин, Вос-β-аланин, Вос-L-фенилаланин, Вос-β-фенилаланин, Вос-L-пролин, Вос-5-аминовалериановая кислота и Вос-4-аминометилбензойная кислота. Чистота полученных соединений оценивалась при помощи ПМР спектров.

Методика получения Fmoc-аминокислот 2. Введение Fmoc-защиты проводили с использованием 9-флуоренил-метилхлорформиата [7] в присутствии карбоната натрия. Замена карбоната натрия на диизопропилэтиламин (DIEA) [14] позволила снизить выход продуктов гидролиза 9-флуоренилметилхлорформиата (дибензофульвена, продуктов его полимеризации и 9-флуоренилметанола).



Метод А. Навеску аминокислоты (20 ммоль) растворяли (или частично суспендировали) при перемешивании в 10% Na₂CO₃ (50 мл), охлаждая на ледяной бане. Затем добавляли 20 мл диоксана и медленно прибавляли раствор 9-флуоренилметилхлорформиата (5,7 г, 22 ммоль) в 50 мл диоксана. Смесь встряхивали в течение 1 ч при 0 °С и затем при комнатной температуре от 3 до 8 ч, в зависимости от аминокислоты. Реакционную смесь разбавляли до 1 л ледяной водой и экстрагировали эфиром 3×200 мл для удаления продуктов разложения хлорформиата: дибензофульвена и его полимеров (R_f = 0,85—0,9; этилацетат/гексан 1:1). Водный слой после охлаждения на ледяной бане подкисляли при помощи конц. HCl до pH 2,0 и экстрагировали этилацетатом 4×200 мл. Объединенные органические фазы промывали 0,1N HCl, затем водой и сушили над сульфатом натрия. После упаривания на роторном испарителе обычно получали вязкое бесцветное масло, которое почти всегда удавалось закристаллизовать в *n*-гептане на ультразвуковой бане.

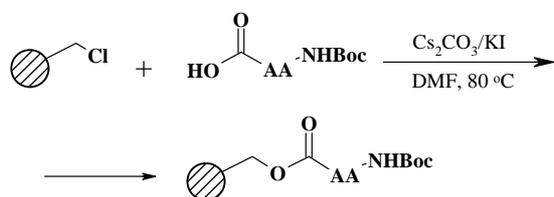
Полученные Fmoc-защищенные аминокислоты окончательно очищали перекристаллизацией из системы этилацетат-гексан. Контроль реакции — по ТСХ: хлороформ/этанол 3:1 (система I) и хлороформ/метанол/уксусная кислота 9:1:0,1 (система II).

Метод Б. В качестве основания применяли DIEA и использовали, как минимум, 20%-ный избыток основания и аминокислоты по отношению к хлорформиату, что позволило увеличить общий выход реакции и значительно уменьшить образование побочных продуктов.

Таким путем с достаточно высокими выходами были получены Fmoc-производные глицина, β-аланина, 4-аминоасляной кислоты, 5-аминовалериановой кислоты, L-аланина, L-фенилаланина, β-фенилаланина, L-аспарагина, DL-валина, L-пролина и 4-аминометилбензойной кислоты. Полученные соединения охарактеризованы при помощи спектров ПМР, по которым оценивалась и чистота продуктов.

Иммобилизацию Boc- и Fmoc-защищенных аминокислот проводили согласно стандартным методикам.

Boc-защищенные аминокислоты иммобилизовали на смолу Меррифильда в присутствии карбоната цезия и йодида калия в качестве катализатора при нагревании до 80—85 °С:



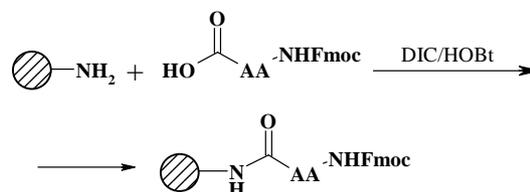
Смолу Меррифильда (1 г, 1,6 ммоль) поместили во флакон на 30 мл, прилили 3 мл DMF. Через 10—15 мин к набухшему полимеру приливали приготовленный раствор, содержащий 5 ммоль Boc-аминокислоты, 1,6 г (5 ммоль) Cs₂CO₃ и каталитические количества NaI (1 ммоль, 0,17 г) с таким расчетом, чтобы общий объем реакционной смеси не превышал 10 мл. Герметически закрытые флаконы помещали в масляную баню и нагревали при 80—85 °С, периодически встряхивая в течение 12 ч. Затем смолу отде-

ляли на стеклянном фильтре, промывали последовательно DMF (20 мл), 10% NH₄Cl (3×30 мл), DMF (20 мл), DCM (2×30 мл), MeOH (2×15 мл). Смолу высушивали в вакуумном шкафу и взвешивали.

Выходы (%) на стадии иммобилизации защищенных аминокислот на смолу Меррифильда составили для различных аминокислот:

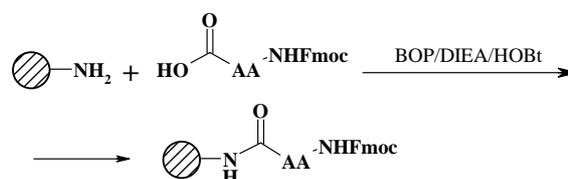
Глицин (Gly).....	94
β-Аланин (β-Ala).....	95
5-Аминовалериановая (5-Ava)...	92
L-Аланин (L-Ala).....	96
L-Фенилаланин (L-Phe).....	82
DL-β-Фенилаланин (DL-β-Phe)..	76
L-Пролин (L-Pro).....	95
4-Аминометилбензойная (Amb)..	97

Fmoc-защищенные аминокислоты иммобилизовали на смолу Ринка при помощи диизопропилкарбодиимида в присутствии 1-гидроксibenзотриазола:



Карбодиимидный метод. Навеску сухой смолы Ринка, содержащей свободные аминогруппы, поместили в 30 мл флакон, прилили 3 мл раствора 0,46 г 1-гидрокси-1*H*-1,2,3-бензотриазола (3 ммоль) в 50% DMF/DCM и оставили смолу набухать в течение 10 мин. Затем к смоле прилили 3—4 мл 50% раствора DMF/DCM, содержащего 3 ммоль Fmoc-аминокислоты, 3 ммоль (0,38 г) N,N'-диизопропилкарбодиимида. При выпадении осадка добавляли дополнительные количества DMF. Герметически закрытые флаконы встряхивали на орбитальном шейкере в течение 15—30 ч. Степень протекания реакции контролировали при помощи теста Кайзера. Как правило, реакция протекает за 4—5 ч для неразветвленных аминокислот, и за 6—9 ч в случае стерически затрудненных аминокислот. После реакции смолу промывали DMF (3×20 мл), DCM (2×20 мл), MeOH (2×10 мл) и высушивали в вакууме. Увеличение массы смолы во всех случаях с высокой степенью коррелировало с рассчитанным выходом реакции.

Стерически затрудненные аминокислоты, такие как L-фенилаланин, L-аспарагин, DL-валин и β-фенилаланин были иммобилизованы на смолу Ринка при помощи (1*H*-1,2,3-бензотриазол-1-илокси)трис-(диметиламино)фосфония гексафторфосфата (BOP), основания диизопропилэтиламина (DIEA) в присутствии 1-гидроксibenзотриазола (HOBt).



К навеске деблокированной смолы Ринка (1 г) приливали 6—7 мл раствора, содержащего 1,33 г (3 ммоль) (1*H*-1,2,3-бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)-фосфония гексафторфосфата (BOP), 3 ммоль Fmoc-аминокислоты и 0,78 г (6 ммоль) DIEA в 50% DMF/DCM). Смесь встряхивали на орбитальном шейкере в течение 5 ч. Смолу отделяли, промывали DMF (2×20 мл), DCM (2×30 мл), MeOH (1×15 мл) и высушивали в вакуумном шкафу. Контролировали реакцию при помощи теста Кайзера.

Выходы (%) на стадии иммобилизации защищенных аминокислот на смоле Ринка для различных аминокислот составили:

Глицин (Gly).....	99
β-Аланин (β-Ala).....	100
4-Аминомасляная (GABA).....	98
5-Аминовалериановая (5-Ava)...	99
L-Аланин (L-Ala).....	98
L-Фенилаланин (L-Phe).....	89
DL-β-Фенилаланин (DL-β-Phe)..	94
DL-Валин (DL-Val).....	90
L-Пролин (L-Pro).....	98
L-Аспарагин (L-Asp).....	87
4-Аминотетрагидропиридин (Amb)..	95

В общей сложности на первой стадии было получено 19 носителей в шкале от 1 г до 4 г, содержащих N-защищенные аминокислоты: 8 аминокислот на основе носителя Меррифилда и 11 аминокислот на основе смолы Ринка.

Выходы на стадии иммобилизации защищенных аминокислот определены на основе гравиметрических данных. Как правило, карбодиимидный метод в случае смолы Ринка приводит к почти количественным выходам иммобилизации. Выход понижается в случае стерически затрудненных аминокислот.

Методика определения степени иммобилизации Fmoc-аминокислот. К смоле, полученной сочетанием 1 г NH₂-формы смолы Ринка AM с Fmoc-аминокислотой в стандартных условиях, приливали 14 мл 25% раствора пиперидина в DMF. Флакон со смолой встряхивали в течение 40—45 мин, затем смолу отделяли на стеклянном фильтре, промывали DMF (3×10 мл). Маточный раствор разбавляли ледяной водой до 250 мл. Выпавший в виде белоснежных хлопьев осадок 1-(9*H*-флуоренил-9-метил)пиперидина отфильтровывали, промывали водой и высушивали в вакууме. *T*_{пл} = 119—120 °С. Спектр ЯМР ¹H (DMSO-d₆), δ, м.д.: 7.77 (H₁₆, H₂₀, m, 2H), 7.33 (H₁₃, H₁₇, d, 2H), 7.15 (H₁₄, H₁₅, H₁₈, H₁₉, m, 4H), 5.21 (CH, t, J=5.5 Hz, 1H), 3.71 (CH₂, d, J=5.15 Hz, 2H), 2.50 (2CH₂, m, 4H), 1.68 (3CH₂, m, 6H). Выход реакции иммобилизации Fmoc-аминокислот на смоле Ринка рассчитывали по формуле:

$$\text{Выход} = \frac{m(\text{осадка}) \cdot 1000}{M \cdot C} \cdot 100\% \quad (3)$$

где *M* = 263.4 — молярная масса 1-(9*H*-флуоренил-9-метил)пиперидина, *C* = 0,73 — емкость смолы Ринка, ммоль/г.

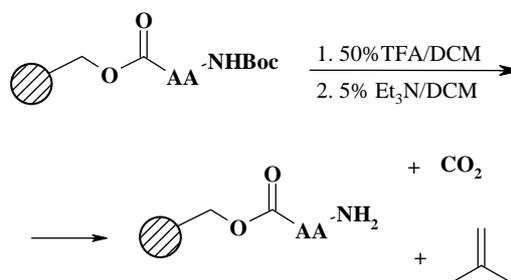
Реализация стадии 2. Снятие защитных групп

После иммобилизации на полимерный носитель следует стадия удаления защитной группы. Свободную

аминогруппу на смоле легко определить тестом Кайзера (см. выше).

Методика выполнения теста Кайзера. В 3-х флаконах приготовили по 50 мл следующих растворов: ~80% фенол в этаноле; смесь воды и пиридина (1:4) с добавлением 1 мл 0,02M р-ра NaCN; 6% раствор нингидрина в этаноле. Небольшое количество смолы из реакционного сосуда перенесли на стеклянный микрофильтр Шотта (на 0,5 мл), смолу промыли трижды MeOH, перенесли в пробирку на 3 мл, добавили по 3 капли каждого из приготовленных растворов и, встряхивая, нагревали пробирку при 120 °С в течение 3—5 мин.

Вос-защиту удаляли 50%-ной трифторуксусной кислотой в течение 0,5 ч. В процессе реакции суспензия смолы вспенивается из-за обильного выделения газообразных продуктов:



Удаление Вос-защиты аминокислот на смоле Меррифилда. Навеску 1 г смолы с иммобилизованной аминокислотой помещали в высокий флакон на 30 мл, приливали 20 мл 55%-го раствора трифторуксусной кислоты (TFA) в дихлорметане (DCM). Выделялся газ, смола приобретала характерный розоватый оттенок. Флакон встряхивали в течение 0,5 ч, после чего смолу отделяли на стеклянном фильтре, промывали DMC (2×20 мл), 10%-ным раствором DIEA в DCM (2×30 мл), DMF (2×10 мл), DCM и MeOH (по 15 мл). Смолу высушивали в вакуумном шкафу и взвешивали. Наличие аминогруппы определяли по тесту Кайзера.

Fmoc-защиту иммобилизованных аминокислот с носителя Ринка селективно удаляли 20%-ным раствором пиперидина в DMF. Промежуточно образующийся дибензофульвен (DBF) быстро реагирует с присутствующим в избытке пиперидином с образованием 1-(9'-флуоренилметил)пиперидина, который нерастворим в воде и выпадает при разбавлении реакционной смеси водой (схема 2).

Взвешивание высушенного осадка 1-(9'-флуоренилметил)-пиперидина позволяет определять выход реакции иммобилизации Fmoc-аминокислот на смоле Ринка по формуле (3).

Выходы (%) при иммобилизации аминокислот на смоле Ринка для различных аминокислот составили:

Глицин (Gly).....	89
β-Аланин (β-Ala).....	90
5-Аминовалериановая (5-Ava)...	84
L-Аланин (L-Ala).....	94
L-Фенилаланин (L-Phe).....	82
L-Пролин (L-Pro).....	86

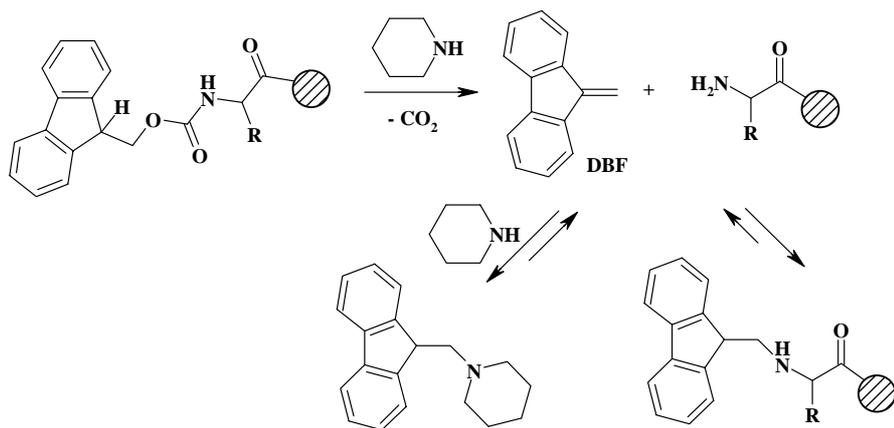


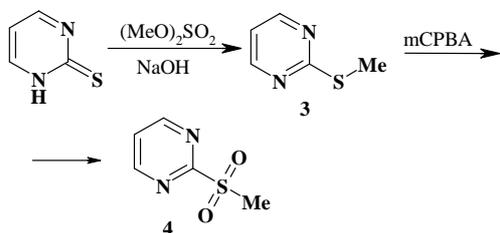
Схема 2

Удаление Fmoc-защиты с аминогруппы на смоле. Навеску смолы, содержащей Fmoc-защиту аминогруппы или Fmoc-защищенную аминокислоту, помещали в стандартный флакон с пористым дном на 30 мл, приливали 20 мл 20% раствора Pir/DMF и встряхивали 10 мин при комнатной температуре. Смолу отделяли от раствора и повторяли процедуру, при этом встряхивали еще 30 мин и затем промывали смолу последовательно DMF (3×30 мл), DCM (2×25 мл) и MeOH. (2×15 мл). Наличие аминогруппы определяли тестом Кайзера.

Синтез гетероциклов с хорошей уходящей группой

Для проведения экспериментов по гетарилрованию аминокислот можно рекомендовать четыре достаточно активных гетероцикла: 2-метилсульфонилпиримидин **4**, 2-бром-5-нитротиазол **5**, 2-фторпиримидин **6** и 2-хлор-5-нитропиримидин **7**.

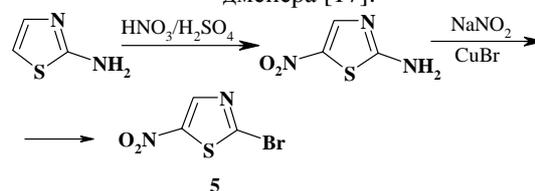
2-Метилсульфонилпиримидин **4** был получен с умеренным выходом окислением 2-метилтиопиримидина **3** *m*-хлорнадбензойной кислотой [15]. Исходный 2-метилтиопиримидин легко получается метилированием продажного пиримидинтиона-2 диметилсульфатом в присутствии гидроксида натрия [16].



К раствору 8,2 (0,065 моль) 2-метилтиопиримидина в 100 мл хлороформа при охлаждении до $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ при сильном перемешивании прикапывали раствор 32 г (0,13 моль) 3-хлорпербензойной кислоты в 300 мл хлороформа в течение 1,5 ч. Затем смесь перемешивали при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение суток. После окончания реакции смесь промыли насыщенным раствором сульфата натрия (2×300 мл), затем насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (2×400 мл). Объединенные органические фазы сушили над сульфатом

натрия. После отгонки растворителя сухой остаток перекристаллизовали из этанола и получили после высушивания 4,75 г (46%) 2-метилсульфонилпиримидина в виде бесцветных кристаллов. $T_{\text{пл}}$ 73—75 $^{\circ}\text{C}$. Контроль по ТСХ: в системе метанол-хлороформ 1: 9 R_f (продукта) 0,6. ПМР спектр (360 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 8,94 (2CH, d, $J=4,3\text{ Hz}$, 2H); 7,58 (CH, t, $J=5,6\text{ Hz}$, 1H); 3,36 (CH_3 , s, 3H).

2-Бром-5-нитротиазол **5** получали нитрованием 2-аминотиазола с последующим диазотированием и введением брома в положение 2 по реакции Зандмейера [17]:

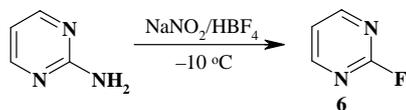


В 0,5 л высоком стакане к 55 мл охлажденной до $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ концентрированной серной кислоте небольшими порциями осторожно прибавляли 20 г 2-аминотиазола (0,2 моль) в течение 0,5 ч. Затем смесь охладили до $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ и по каплям прибавляли в течение 25 мин 10 мл дымящей азотной кислоты (0,23 моль) при сильном перемешивании. Раствор оставили на 3 дня при комнатной температуре в открытом стакане. Затем смесь ярко-оранжевого цвета вылили в 150 мл ледяной воды. К полученному раствору прилили раствор 100 г бромида натрия и 100 г медного купороса в 200 мл воды. Смесь охладили до $3\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$ и диазотировали раствором 25 г нитрита натрия в 35 мл воды при сильном перемешивании в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавили водой до 500 мл и экстрагировали эфиром (3×200 мл). Объединенные органические фазы сушили над прокаленным сульфатом натрия. Эфир отогнали на роторном испарителе, остаток перегнали с паром. После высушивания получили 15,89 г (38%) 2-бром-5-нитротиазола в виде светлых белых кристаллов. ТСХ: $R_f=0,51$ в системе гексан-этилацетат 5:1. $T_{\text{пл}}$ 88—91 $^{\circ}\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H (360 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 8,30 (CH, s, 1H).

Следует добавить, что ПМР спектр соединения несет недостаточно информации и представлен лишь одним сигналом со сдвигом 8,3 м.д. Спектр ИК (KBr) дает более полную информацию о соединении: 3084 (вал., C-H), 1520as, 1344s (NO_2), 740 (C-Br). Для сравнения можно использовать ИК-спектр тиазола **5** с сайта компании Acros (www.acros.com).

2-Фторпиримидин **6** получали диазотированием 2-аминопиримидина при действии нитрита натрия в 48%-ной HBF_4 [10]. 2-Фторпиримидин является настолько реакционноспособным соединением, что при попытке нейтрализовать реакционную смесь действием 1N NaOH по методике [10] мы неизбежно получали продукт гидролиза — пиримидон-2. Оказалось, что

замена раствора гидроксида натрия на суспензию гидрокарбоната натрия, а также проведение синтеза и стадии нейтрализации при сильном охлаждении (до $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) повышают выход 2-фторпиримидина до 40–45%.



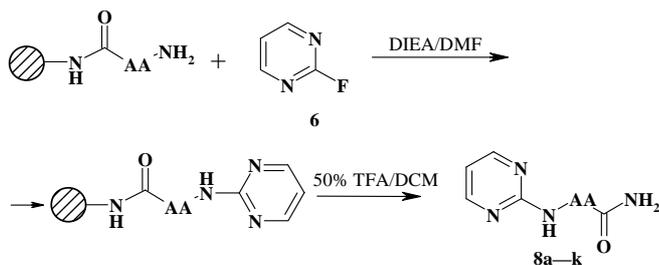
В высокий фарфоровый стакан на 1 л налили раствор 15,3 г 2-аминопиримидина (0,16 моль) в 500 мл 48%-ной тетрафторборной кислоте, охладили до $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ и диазотировали при интенсивном перемешивании раствором 22,8 г нитрита натрия (0,32 моль) в 35 мл воды в течение 1 ч. После окончания прибавления нитрита натрия смесь перемешивали еще 1 ч при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем смесь нейтрализовали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия до pH 6–7 при охлаждении, экстрагировали эфиром (4×250 мл). Объединенные органические фазы промыли 2%-ным раствором карбоната калия (2×100 мл) и сушили над прокаленным сульфатом натрия. Растворитель отогнали при температуре водяной бани не выше $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Маслообразный остаток перегнали под вакуумом и получили 6,4 г (41%) прозрачной легкоподвижной жидкости с $T_{\text{кип}}\ 72\text{--}73\text{ }^{\circ}\text{C}/20\text{ мм. рт. ст.}$ Полученный продукт хранится при $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ без заметных признаков разложения в течение 10 дней. Контроль по ТСХ: $R_f=0,61$ в системе гексан-этилацетат 1:1. ПМР спектр (360 MHz CDCl_3) δ , м.д.: 8.66 (2CH, q, $J_{\text{C4(6),5}}=6\text{ Hz}$, $J_{\text{C4,F}}=1.7, 2\text{H}$); 7.38 (CH, q, $J_{\text{C4,5}}=6\text{ Hz}$, $J_{\text{C5,F}}=1.7, 1\text{H}$).

2-Хлор-5-нитропиримидин 7. Использовали продажный реагент. (Синтез соединения 7 подробно описан в [18].)

Реализация стадии 3 (нуклеофильное замещение на твердой фазе) и стадии 4 (снятие продукта с полимерного носителя)

Синтез производных N-(пиримидин-2-ил)аминокислот

Реакцию нуклеофильного замещения с участием иммобилизованных на смоле Ринка аминокислот выполняли с применением 2-фторпиримидина 6 и диизопропилэтиламина (DIEA) в качестве основания. В процессе реакции объем смолы в растворе уменьшался в 1,5–2 раза, что также свидетельствовало о прохождении реакции. Реакцию контролировали при помощи теста Кайзера на аминогруппу, отбирая из реакционной смеси малые порции смолы.



Полученные простые амиды N-(пиримидин-2-ил)аминокислот снимали с носителя действием 50%-ной

трифторуксусной кислоты. Вещества 8a–k очищали колоночной хроматографией. Структура полученных веществ подтверждена при помощи спектров ПМР и масс-спектрометрии. Данные элементного анализа и спектры ПМР приведены в табл. 3 и 4.

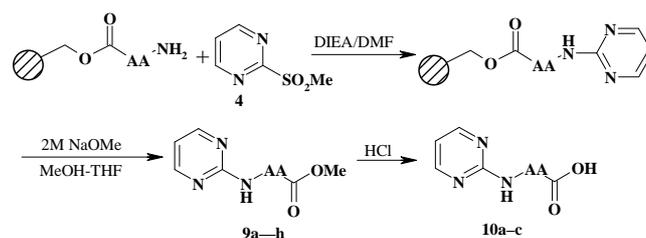
Таблица 3

Данные элементных анализов амидов 8

Соединение		Содержание элемента, %		
		H	C	N
	Теор.	5,26	47,32	36,84
	Эксп.	5,74	46,88	36,57
	Теор.	6,02	50,54	33,69
	Эксп.	6,73	49,48	32,6
	Теор.	6,66	53,27	31,07
	Эксп.	6,38	52,51	30,95
	Теор.	7,2	55,6	29,86
	Эксп.	6,89	53,75	29,32

Синтез амидов N-(пиримидин-2-ил)аминокислот. К 0,5 г смолы Ринка, содержащей незащищенную аминокислоту, прилили 5 мл раствора 0,52 (4 ммоль) DIEA в абсолютном DMF. Через 7–10 мин к увеличившейся в объеме смоле прибавили 0,39 г (4 ммоль) 2-фторпиримидина. Флаконы герметично закрыли и нагревали при $50\text{--}55\text{ }^{\circ}\text{C}$ при периодическом перемешивании. При помощи теста Кайзера найдено, что реакция протекает практически полностью за 7–12 ч. Прореагировавшую смолу последовательно промывали на фильтре DMF (15 мл), DMF/DCM (15 мл 50%), DCM (2×25мл), MeOH (2×15 мл). Смолы после высушивания в вакуумном шкафу помещали в флаконы на 30 мл, приливали по 15 мл 60% TFA/DCM и встряхивали на орбитальном шейкере в течение 1 ч. Смолу отделяли на стеклянном фильтре, промывали абсолютным DCM (15 мл) и MeOH (15 мл). Фильтрат упаривали на роторном испарителе. К маслообразному остатку приливали абсолютный MeOH (5 мл) и снова упаривали. Процедуру повторяли до исчезновения трифторуксусной кислоты. Полученное вещество при необходимости очищали колоночной хроматографией (MeOH- CHCl_3 4:1) на силикагеле. ТСХ проводили в системе MeOH- CHCl_3 4:1. Выход (табл. 4) рассчитывали на основе стандартной емкости смолы.

В качестве активированного пиримидина для реакции с аминокислотами на смоле Меррифильда выбрали 2-метилсульфонилпиримидин 4:



В процессе реакции контроль осуществляли при помощи теста Кайзера на аминогруппу. Снятие со смолы

Выходы и характеристики производных амидов и эфиров N-(пиримидин-2-ил)аминокислот (ЯМР ^1H при 360 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

Соединение	№	X	ЯМР ^1H , δ , м.д.			M^+ , m/z (масс-спектр.)	Выход, %
			$\text{H}_{4,6}$	H_5	NH		
	9a	MeO	8,22	6,55	7,14	167	85
	8a	NH_2	8,32	6,54	7,09	152	96
	9b	MeO	8,19	6,46	6,75	181	94
	8b	NH_2	8,31	6,63	7,31	166	98
	9c	NH_2	8,36	6,75	6,64	180	87
	8c	MeO	8,26	6,53	6,85	209	34
	9d	NH_2	8,28	6,56	6,47	194	65
	8d	MeO	8,22	6,54	7,14	182	79
	9e	NH_2	8,33	6,54	7,25	166	88
	8e	MeO	8,25	6,53	6,66	217	32
	9f	NH_2	8,20	6,53	7,45	242	49
	8f	MeO	8,31	6,68	6,58	218	11
	9g	NH_2	8,19	6,48	6,58	242	23
	8g	MeO	8,34	6,74	7,27	209	28
	9h	NH_2	8,34	6,74	7,27	209	28
	8h	NH_2	8,34	6,74	7,27	209	28
	9i	NH_2	8,25	6,57	6,81	195	35
	8i	NH_2	8,25	6,57	6,81	195	35
	9j	MeO	8,25	6,71	—	208	52
	8j	NH_2	8,27	6,57	—	192	72
	9k	MeO	8,48	6,81	7,46	244	74
	8k	NH_2	8,18	6,59	7,07	228	83

Меррифилда проводили в присутствии метилата натрия. Полученные эфиры N-(пиримидин-2-ил)аминокислот **9a-h** охарактеризованы масс-спектрами и спектрами ПМР (см. табл. 4). На трех примерах гидролизом соответствующих эфиров была продемонстрирована

возможность получения для этого класса свободных аминокислот (N-(пиримидин-2-ил)аминокислоты **10a-c**).

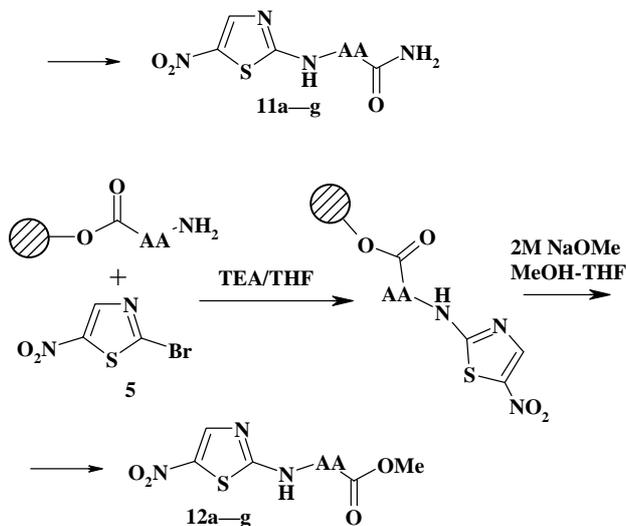
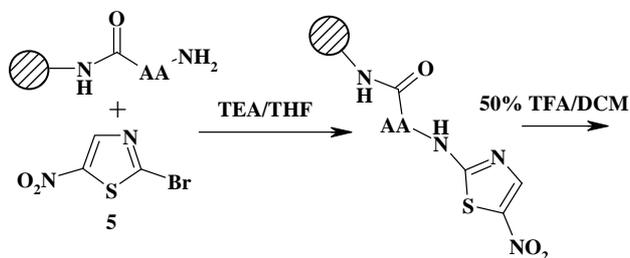
Синтез метиловых эфиров N-(пиримидин-2-ил)аминокислот **10**. К навескам по 1 г смолы Меррифилда, содержащей незащищенную аминокислоту, приливали 6 мл рас-

творя 0,65 (5 ммоль) DIEA в абсолютном DMF. Через 5 мин к смоле прибавили по 0,79 г (5 ммоль) 2-метилсульфонилпиримидина. Флаконы герметично закрыли и нагревали при 80—90 °С, периодически перемешивая. Степень протекания реакции контролировали при помощи теста Кайзера. Прореагировавшую смолу последовательно промывали на фильтре DMF (25 мл), DCM (2×25мл), MeOH (2×15 мл). Смолы помещали в стандартные 30 мл флаконы, приливали абс. THF (3 мл), 2M NaOMe в MeOH (1 мл), флаконы герметично закрывали и встряхивали при комнатной температуре в течение 6 ч. Смолу отделяли на стеклянном фильтре, промывали MeOH, THF. Фильтрат нейтрализовывали 10% HCl и упаривали на роторном испарителе. Из полученного сухого остатка экстрагировали сложный эфир метанолом, экстракт фильтровали и упаривали на роторе. Полученные вещества, при необходимости, очищали колоночной хроматографией (MeOH-CHCl₃ 2:9) на силикагеле. Выход (табл. 4) рассчитывали на основе емкости смолы. ТСХ проводили в системе MeOH-CHCl₃ 2:9.

Синтез аминокислот 10 из эфиров 9. Эфир 9 (50—200 мг) растворяли в 5 мл 40% водного раствора MeOH и добавляли 1 мл конц. HCl. Раствор нагревали при 60 °С в течение 10—15 мин. Раствор упаривали, кислоту очищали перекристаллизацией из водного MeOH. ТСХ в системе MeOH-CHCl₃-AcOH 1:3:0,2. Кислоты 10 получают в шкале 30—150 мг.

Синтез производных N-(5-нитротиазол-2-ил)аминокислот

Иммобилизованные на смолах Ринка и Меррифильда аминокислоты вводили в реакцию с 2-бром-5-нитротиазолом 5 в присутствии триэтиламина:



Синтез амидов N-(5-нитротиазол-2-ил)аминокислот. К навескам по 0,5 г смолы Ринка, содержащей незащищенные аминокислоты, приливали по 4 мл раствора 0,2 (2 ммоль) триэтиламина в абсолютном DMF. Через 10 мин к смолам прибавляли по 0,42 г (2 ммоль) 2-бром-5-нитротиазола. Флаконы герметично закрыли и охладили до 5 °С при постоянном встряхивании. При помощи теста Кайзера найдено, что реакция протекает практически полностью за 1—2 ч. Прореагировавшую смолу последовательно промывали на фильтре DMF (4×10 мл), DCM (2×15 мл), MeOH (2×15 мл). Смолы после высушивания в вакуумном шкафу помещали в флаконы на 30 мл, приливали по 55% TFA/DCM (10 мл) и встряхивали на орбитальном шейкере в течение 1 ч. Смолу отделяли на стеклянном фильтре, промывали абс. DCM (5 мл) и абс. MeOH (5 мл). Фильтрат упаривали на роторном испарителе. К маслообразному остатку приливали абс. MeOH (5 мл) и снова упаривали. Процедуру повторяли до исчезновения трифтороуксусной кислоты. Полученное вещество при необходимости очищали колоночной хроматографией (MeOH-CHCl₃ 1:2) на силикагеле. Выход рассчитывали на основе средней емкости смолы. Таким образом, (в шкале 50—150 мг) были получены амиды 11a—e,f,g.

Синтез метиловых эфиров N-(5-нитротиазол-2-ил)аминокислот. К навескам по 0,5 г смол Меррифильда, содержащих иммобилизованные незащищенные аминокислоты, прилили по 3 мл раствора, содержащего 0,3 г (3 ммоль) триэтиламина в абс. THF. Через 10 мин к суспензии смол прилили по 3 мл раствора 0,65 г (3 ммоль) 2-бром-5-нитротиазола в THF. Реакции проводили на холоду, периодически встряхивая флаконы. Смолы окрашивались в интенсивно-красный цвет. Через 10 ч смолы отделили на стеклянном фильтре, промыли DMF (2×20 мл), DCM (2×30 мл) и MeOH (2×15 мл). Смолы высушивали в вакуумном шкафу и взвешивали. Сухие смолы помещали в стандартный 30 мл флакон, приливали абс. THF (3 мл), 2M NaOMe в MeOH (1 мл), флаконы герметично закрывали, встряхивали при комнатной температуре в течение 6—12 ч. Смолу отделяли на стеклянном фильтре, промывали 30%-ным раствором MeOH в THF, фильтрат нейтрализовывали 10% HCl и упаривали на роторном испарителе. Из полученного сухого остатка экстрагировали сложный эфир метанолом, экстракт упаривали на роторном испарителе. Продукты перекристаллизовывали из системы гексан-этилацетат 3:1 и высушивали в вакуумном шкафу. Таким образом (в шкале 20—170 мг), были получены эфиры 12a—g.

В случае обоих типов смол наблюдалось появление интенсивной желто-красной окраски смол. При помощи теста Кайзера определено, что реакция с 2-бром-5-нитротиазолом протекает при комнатной температуре за 3—6 ч.

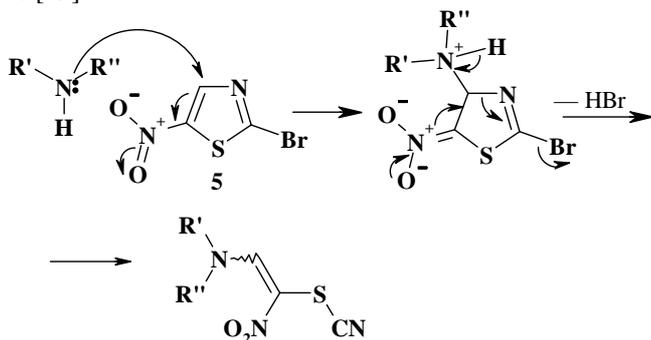
Полученные таким образом простые амиды и метиловые эфиры N-(тиазол-2-ил)аминокислот были охарактеризованы масс-спектрами и спектрами ПМР. Характеристики соединений 11a-g и 12a-g представлены в табл. 5.

Выходы и хроматографическая чистота полученных производных N-(тиазол-2-ил)аминокислот оказались ниже, чем в случае производных N-(пиримидин-2-ил)аминокислот. Можно предположить, что наряду с основной реакцией нуклеофильного замещения в

Выходы и характеристики амидов 11 и эфиров 12 на основе N-(5-нитротиазол-2-ил)аминокислот

Соединение	№	X	ЯМР ¹ H, δ, м.д.		[M ⁺ -NO ₂], m/z (масс-спектр.)	Выход, %
			H ₄	NH		
	12a	MeO	8,07	7,25	172	81
	11a	NH ₂	8,09	7,53	157	85
	12b	MeO	7,95	7,32	186	89
	11b	NH ₂	7,94	7,56	171	76
	11c	NH ₂	8,12	7,37	184	79
	12c	MeO	7,91	7,34	214	92
		NH ₂	—	—	198	—
	12d	MeO	7,99	7,41	186	84
	11d	NH ₂	8,07	7,45	171	88
	12e	MeO	7,90	—	262	38
	11e	NH ₂	8,08	7,82	247	27
	12f	MeO	7,92	—	262	52
		NH ₂	—	—	248	—
	11f	NH ₂	8,01	7,89	185	22
	12g	MeO	7,95	7,37	248	64
	11g	NH ₂	8,11	7,65	233	55

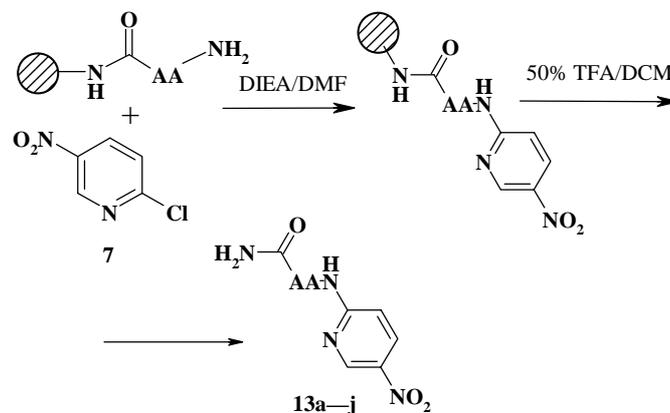
2-бром-5-нитротиазоле протекает побочный процесс с раскрытием тиазольного цикла, упомянутый в работе [19]:



Синтез производных
N-(5-нитропиридин-2-ил)аминокислот

Производные N-(пиридин-2-ил)аминокислот на смоле Ринка получали с применением продажного 2-хлор-5-нитропиридина **7** и диизопропилэтиламина (DIEA) в качестве основания. В процессе наблюдалось потемнение носи-

теля. Реакцию контролировали при помощи теста Кайзера на аминогруппу. Было показано, что в среднем реакция протекает при 90—95 °С в течение 5—6 ч.



Синтез амидов N-(5-нитропиридин-2-ил)аминокислот. К навескам по 0,5 г смолы Ринка, содержащей незащищенные аминокислоты, приливали по 4 мл раствора 0,39 (3 ммоль) диизопропилэтиламина в абсолютном DMF. Через 10 мин к смолам прибавляли по 0,73 г (3 ммоль)

Таблица 6

Данные ЯМР ^1H (360 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) и характеристика производных N-(5-нитропиридин-2-ил)аминокислот

Соединение	№	X	ЯМР ^1H , δ , м.д.			Чистота продуктов*	Выход, %
			H ₆	H ₄	H ₃		
	14a	MeO	8,87	8,15	6,53	B	57
	13a	NH ₂	8,87	8,16	6,77	B	72
	14b	MeO	8,84	7,96	6,57	C	68
	13b	NH ₂	8,82	7,98	6,55	C	60
	14c	MeO	8,83	7,98	6,51	C	57
	13c	NH ₂	8,83	7,98	6,51	C	57
	14d	MeO	8,82	8,09	6,61	C	70
	13d	NH ₂	8,83	7,97	6,54	C	47
	14e	MeO	8,80	8,14	6,65	B	52
	13e	NH ₂	8,83	7,97	6,62	C	84
	-	MeO	—	—	—	—	—
	13f	NH ₂	8,80	8,16	6,67	B	28
	-	MeO	—	—	—	—	—
	13g	NH ₂	8,81	7,97	6,58	C	18
	14h	MeO	8,83	8,03	6,81	B	12
	13h	NH ₂	8,83	8,03	6,81	B	12
	-	MeO	—	—	—	—	—
	13i	NH ₂	8,88	8,12	6,78	—	32
	14j	MeO	8,85	8,14	6,55	A	69
	13j	NH ₂	8,84	8,02	6,59	A	39

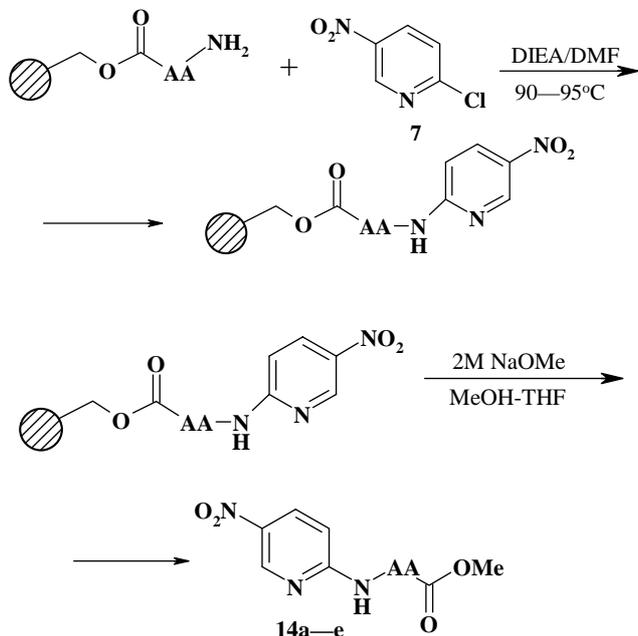
* Чистоту продуктов **13a-g** и **14a-e** оценивали по спектрам ПМР по шкале: А (<5% примесей), В (<10% примесей), С (>20% примесей).

2-хлор-5-нитропиридина. Флаконы герметично закрыли и нагревали до 95 °С при периодическом встряхивании в течение 12 ч. Прореагировавшую смолу последовательно промывали на фильтре DMF (4×10 мл), DCM (2×15 мл), MeOH (2×15 мл). Смолы после высушивания в вакууме помещали в флаконы емкостью 30 мл, приливали по 10 мл 50% TFA/DCM и встряхивали на орбитальном шейкере в

течение 1 ч. Смолу отделяли на стеклянном фильтре, промывали абс DCM (10 мл) и абс. MeOH (5 мл). Фильтрат упаривали на роторном испарителе. К маслообразному остатку приливали абс. MeOH (5 мл) и снова упаривали. Процедуру повторяли до исчезновения трифторуксусной кислоты. Полученное вещество при необходимости очищали перекристаллизацией из системы гексан-этилацетат.

Выход рассчитывали на основе средней емкости смолы. Таким образом (в шкале 30—160 мг) были получены амиды **13a—g**.

Сложные эфиры **14** получали аналогичным образом с использованием смолы Меррифилда:



Синтез метиловых эфиров *N*-(5-нитропиридин-2-ил)аминокислот. К навескам по 0,5 г смол Меррифилда, содержащим незащищенные аминокислоты, приливали по 4 мл раствора 0,39 (3 ммоль) диизопропилэтиламина в абсолютном DMF. Через 10 мин к смолам прибавляли по 0,73 г (3 ммоль) 2-хлор-5-нитропиридина. Флаконы герметично закрыли и нагревали до 90—95 °С при периодическом встряхивании в течение 10—14 ч. Прореагировавшую смолу последовательно промывали на фильтре DMF (4×10 мл), DCM (2×15 мл), MeOH (2×15 мл), высушивали в вакуумном шкафу и взвешивали. Сухие смолы помещали в стандартный 30 мл флакон, приливали абс. THF (3 мл), 2M NaOMe в MeOH (1 мл), флаконы герметично закрывали, встряхивали при комнатной температуре в течение 5—7 ч. Смолу отделяли на стеклянном фильтре, промывали 30%-ным раствором MeOH в THF, фильтрат нейтрализовывали 10% HCl и упаривали на роторном испарителе. Из полученного сухого остатка экстрагировали сложный эфир метанолом, экстракт упаривали на роторном испарителе. Таким образом (в шкале 65—100 мг) были получены эфиры **14a—e**.

Полученные с использованием смолы Меррифилда соединения **13a—g** и **14a—e** были охарактеризованы спектрами ПМР (табл. б).

Заключение

Проведенная нами в студенческом практикуме оптимизация 4-стадийной твердофазной реакции получения не природных аминокислот весьма удобна с методи-

ческой точки зрения. Синтез веществ не требует специфического оборудования, выходы конечных веществ высоки, а выделяемых количеств достаточно для полноценной характеристики.

Проведение реакции в параллельном режиме можно осуществлять, варьируя число аминокислот и гетарилирующих агентов (например, в формате 2×2, 2×3 или 3×3). Наборы самих аминокислот (в отличие от аминокислот, иммобилизованных на смолах) коммерчески доступны и дешевы. В этой связи выбор общего числа стадий при использовании данной задачи в учебных целях должен определяться возможностями учебной лаборатории. Нашу задачу мы видели в отработке *полного цикла* (включая стадии защиты и иммобилизации аминокислот).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ermolat'ev D.S., Babaev E.V. *Molecules*, 2003, v. 8, p. 467—471/
<http://www.mdpi.org/molecules/papers/80600467.pdf>
2. Ermolat'ev D.S., Babaev E.V. *ARKIVOC*, 2005, p.172—178.
http://www.arkivoc.com/ark/journal/2005/I04_Zefirov/1364/1364.pdf
3. Larsen S.D., Connell M.A., Cudahy M.M. *e.a.* *J. Med. Chem.*, 2001, v. 44, p. 1217—1230.
4. Vailancourt V.A., Larsen S.D., Tanis S.P. *e.a.* *Ibid.*, 2001, v. 44, p. 1231—1248.
5. Nicolau K.C., Hanco R., Hartwig W. *Handbook of combinatorial chemistry*. Wiley-VCH, 2002, v. 1.
6. Berger G.H. *Synth. Commun.*, 1993, v. 23, p. 1443—1445.
7. Carpino L.A., Grace Y.H. *J. Org. Chem.*, 1972, v. 37, № 22, p. 3404—3409.
8. Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. *Anal. Biochem.*, 1970, v. 34, p. 595—611.
9. Brown D.J., Waring P.J. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, 1974, v. 2, p. 204—208.
10. Brown D.J., Ford P.W. *J. Chem. Soc. (C)*, 1967, p. 568—572.
11. James I.W. *Tetrahedron*, 1999, v. 55, p. 4855—4946.
12. Kobayashi S., Akiyama R., Kitagawa H.J. *Comb. Chem.*, 2000, v. 2, p. 4238—440.
13. Tarbell, D.S., Yamamoto Y., Pope B.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, v. 69, p. 780—786.
14. Greene T.W., Peter G.M. *Protective groups in organic synthesis*. Wiley-VCH. 1999, Ch. 6.
15. Adlington R.M., Baldwin J.E., Catterick D., Pritchard G.J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1999, p. 855—866.
16. Boarland M.P.V., McOmie J. F. W. *J. Chem. Soc.*, 1952, p. 3716—3722.
17. Deshpande R.N., Nargund K.S. *J. Pract. Chem.*, 1974, v. 316, № 2, p. 349—352.
18. Чучибабин А.Е. *Ж. Рос. физико-химического об-ва*, 1914, т. 46(2), с. 1236—1296.
19. Ilvespaa A.O. *Helv. Chim. Acta*, 1968, v. 51, № 7, p. 1723—1733.