

УДК 541.64.547(83+466)

СИНТЕЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОЛИАМИНОКИСЛОТ НА ЦИКЛОФОСФАЗЕНОВЫХ ТЕМПЛАТАХ¹

© 2006 г. Г. В. Попова*, Д. А. Алекперов*, Т. Sakurai**, Н. Ihara**, В. В. Киреев*

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева
125190 Москва, Миусская пл., 9

**Kitamoto University, Kitamoto 850-8555, Japan

Поступила в редакцию 19.10.2005 г.

Принята в печать 04.03.2006 г.

С использованием гексакис(*n*-аминофенокси)циклотрифосфазена и тетрафенилтетрааминоцикло-тетрафосфазена, первичные аминогруппы которых инициировали полимеризацию N-карбоксиангидридов *L*- α -аланина и γ -эфиров *L*- α -глутаминовой кислоты, получены полиаминокислоты с неорганическим центральным циклом. Мольное соотношение мономер : инициатор варьировали для получения пептидных цепей различной длины. ММ синтезированных образцов хорошо совпадали с вычисленными значениями, полимеры имели узкое ММР ($M_w/M_n < 1.3$). Данные спектров кругового дихроизма и ИК-спектроскопии показали преимущественно спиральную конформацию цепей полиаминокислот с центральным трифосфазенным циклом и неупорядоченную структуру цепей полиаминокислот, связанных с циклотетрафосфазеном.

Органо-неорганические гибридные соединения являются постоянными объектами исследования в химии, физике, материаловедческих науках, так как они проявляют синергизм свойств отдельных составляющих, экологически безопасны, обладают необычными качествами. Циклофосфазены можно рассматривать как почти идеальные объекты для получения их различных органических модификаций в силу особенности строения, полифункциональности, достаточно легкой биодеградируемости. Циклофосфазены, связанные с полимерными производными, являются перспективными соединениями для получения супрамолекулярных ансамблей различной архитектуры – дендримеров, металлокомплексов, ионсодержащих систем и т.д. [1–3]. Поэтому нам представлялось интересным разработать пути получения биомиметических гибридолов, используя циклофосфазены как неорганические темплаты (матрицы, шаблоны) для присоединения полиаминокислотных цепей, рассмотреть конформационные состояния синтезированных производных, а также

возможность применения их как матриц для дальнейшей иммобилизации различных хромофоров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гексахлорциклотрифосфазен дважды перекристаллизовывали из гексана, $T_{пл} = 113$ –114°C. *n*-Нитрофенол, гидрид натрия, диоксид платины (“Aldrich”), ДМФА (для пептидного синтеза), анилин (“Wako”), γ -бензил-*L*-глутамат (“Wako”) и γ -метил-*L*-глутамат (“Aldrich”) применяли без дополнительной очистки. Тетрагидрофуран очищали кипячением с бензофеноном и натрием, а затем перегонкой над алюмогидридом лития.

Гексакис(4-нитрофенокси)циклотрифосфазен синтезировали в соответствии с методом [4], $T_{пл} = 263$ –265°C. ЯМР ^{31}P (ДМСО- d_6) – δ, м.д.: 8.32 (с). ЯМР ^1H (ДМСО- d_6) – δ, м.д.: 8.15 и 7.30 (каждый d_{AB} , каждый 12Н, аром.). ИК (КBr), см $^{-1}$: 1590 (аром.), 1520 и 1350 (нитрогруппа); 1210, 1185 и 1160 (фосфазенный цикл).

Гексакис(4-аминофенокси)циклотрифосфазен (I) получали следующим образом. В автоклав емкостью 500 мл помещали 10 г (10.4 ммоля) гексакис(4-нитрофенокси)циклофосфазена, 100 мл анилина и 0.02 г диоксида платины. Смесь продували сухим азотом в течение 10 мин, вакуумировали автоклав и гидрировали при давлении водорода 2.5 атм и температуре 50°C при интенсивном

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 03-03-33157) в рамках Проекта “Разумные органические молекулярные материалы”, Подпрограммы № 4 Министерства образования и науки Российской Федерации “Межнациональнное научно-образовательное сотрудничество”.

E-mail: galina@muctr.edu.ru (Попова Галина Викторовна).

перемешивании в течение 48 ч. После охлаждения катализатор отфильтровывали и растворитель отгоняли под вакуумом. Полученное вязкое масло (около 5 мл) растворяли в минимальном количестве концентрированной соляной кислоты, раствор обесцвечивали активированным углем и уголь отфильтровывали. К фильтрату при перемешивании добавляли по каплям 10%-ный раствор гидроксида калия, полученный осадок отфильтровывали и промывали последовательно водой, этанолом и гексаном. После перекристаллизации из *o*-дихлорбензола получали 6.2 г (77%) соединения I в виде бесцветных пластинок с $T_{пл} = 171\text{--}173^{\circ}\text{C}$. ЯМР ^{31}P (ДМСО- d_6) – δ, м.д.: 11.07 (с). ЯМР ^1H (ДМСО- d_6) – δ, м.д.: 6.44 и 6.54 (каждый d_{AB} , каждый 12Н, аром.) и 4.92 (с, 12Н, амин). ИК (КВг), см $^{-1}$: 1625 (амин), 1508 (аром.), 1195, 1178 и 1165 (фосфазеновый цикл).

Тетрафенилтетрааминоциклотрифосфазен (II) синтезировали в соответствии с работой [5], $T_{пл} = 225^{\circ}\text{C}$. ЯМР ^{31}P (ДМСО- d_6) – δ, м.д.: -3 (с). ЯМР ^1H (ДМСО- d_6) – δ, м.д.: 6.52–7.19 (м, 20Н, аром.), 8.80 (с, 8Н, амин). ИК (КВг), см $^{-1}$: 1440 (аром.), 3400 и 3380 (амин), 1200 (фосфазеновый цикл).

N-Карбоксиангидрид γ-бензил-L-глутамата (БГ-КА) синтезировали путем фосгенирования γ-бензил-L-глутамата, используя трифосген в сухом ТГФ в соответствии с методом [6], $T_{пл} = 97\text{--}98^{\circ}\text{C}$. ЯМР ^1H (CDCl_3) – δ, м.д.: 7.3–7.4 (м, 5Н, аром.), 6.71 (с, 1Н, NH), 5.14 (с, 2Н, CH_2 -бензил), 4.40 (т, 1Н, CH), 2.61 (м, 2Н, глутамат γ-C), 2.10–2.31 (м, 2Н, глутамат β-C). ИК (КВг), см $^{-1}$: 1859 и 1789 (C=O, ангидридный), 1730 (C=O, сложный эфир).

N-Карбоксиангидрид γ-метил-L-глутамата (МГ-КА) синтезировали аналогично, $T_{пл} = 99\text{--}100^{\circ}\text{C}$. ЯМР ^1H (CDCl_3) – δ, м.д.: 6.48 (с, 1Н, NH), 4.40 (т, 1Н, CH), 3.70 (с, 3Н, метил), 2.60 (м, 2Н, глутамат γ-C), 2.05–2.28 (м, 2Н, глутамат β-C). ИК (КВг), см $^{-1}$: 1855 и 1786 (C=O, ангидридный), 1728 (C=O, сложный эфир).

Полимеризацию БГ-КА и МГ-КА проводили в растворах сухого ТГФ или ДМФА по типичной методике, одна из которых приведена ниже.

Раствор 28 мг (35.7 мкмоля) соединения I в 5 мл ДМФА прибавляли к перемешиваемому раствору 1 г (5.3 ммоля) МГ-КА в 8 мл ДМФА при комнатной температуре. Смесь перемешивали 36 ч и затем выливали в большой избыток сухого диэтилового эфира. Полученный продукт очищали, дважды переосаждали его из раствора в гексафторизопропаноле диэтиловым эфиром. Выход 1.007 г (98%).

Хроматографический контроль однородности химических соединений осуществляли на пластинах Silufol UV-254. Проявители: нингидрин, пары иода, УФ-облучение.

Спектры ЯМР записывали на приборе "Varian" (400 МГц), внутренний стандарт для спектров ЯМР ^1H – тетраметилсилан, для спектров ЯМР ^{31}P – 0.485 М трифенилfosфат в CDCl_3 .

Круговой дихроизм измеряли в гексафторизопропаноле на спектрополяриметре "Jasco J-725" в 3 мл кювете длиной пути 1 см, со сканированием от 300 до 185 нм каждые 0.5 нм, в среднем 8 сканирований. ИК-Фурье спектры записывали на спектрометре FTIR-5M в таблетке KBr и пленке из смеси гексафторизопропанол : хлороформ = 1 : 1.

ММ определяли методом ГПХ на высокоскоростном жидкостном хроматографе "Waters-600" при 30°С, элюент ДМФА, адсорбент TSK gel Super NMM, стандарт ПС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ опубликованных данных по синтезу полимерных производных циклотрифосфазенов [1, 7] показывает необходимость первоначального получения циклофосфазеновых темплатов, в которых атомы хлора замещены на функциональные органические спейсеры. Для циклотрифосфазена наиболее стабильный мостиковой группой является феноксигруппа, позволяющая вводить якорные реакционноспособные функциональные фрагменты карбокси- или аминогрупп. Последние представляют специальный интерес, поскольку могут инициировать полимеризацию N-карбоксиангидридов полиаминокислот, присоединяясь к полимерной цепи. В соответствии с этим гексахлорциклотрифосфазен подвергали алкоголизу *n*-нитрофенолом с последующим катализитическим восстановлением на PtO₂ согласно общей методике, предложенной Allcock [4].

Ранее было показано, что как в $[\text{NPX}_2]_3$, X = Cl, Br и OPh [8], так и в $[\text{NP}(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_5)_2]_3$ [9], фосфазеновое кольцо деформировано, но почти плашечно, и боковые феноксигруппы ориентированы перпендикулярно в *транс*-положении к плоскости кольца. Это позволяет предположить, что полiamинокислотные производные циклотрифосфазена могут также представлять собой симметричные *транс*-конформеры относительно кольца фосфазена.

Полимеризацию КА γ-эфиров (метилового или бензилового) L-α-глутаминовой кислоты в присутствии соединения I проводили в ДМФА при

комнатной температуре, удаляя выделяющийся углекислый газ током аргона, при мольном соотношении мономер : инициатор, равном 8, 20, 40 (для каждой из шести боковых растущих на циклотрифосфазене цепей). Контроль реакции осуществляли ИК-спектроскопически (по исчезновению характеристических полос поглощения 1860 и 1780 cm^{-1} , относящихся к валентным колебаниям карбонильных групп КА) и методом ЯМР ^1H , по исчезновению пиков ароматических протонов *n*-аминогрупп в 4-аминофенокси-радикалах соединения I ($\delta = 6.44\text{--}6.54$ м. д.). В спектрах ЯМР ^{31}P для исходного соединения I наблюдали синглет с $\delta = 12.3$ м.д., хим. сдвиг которого после присоединения полиаминокислотных цепей практически не изменился ($\delta = 12.5$ м.д.). Указанные спектральные данные подтверждают полноту реакции полимеризации по всем шести инициирующим центрам циклотрифосфазена. Полученные полимеры представляли собой белую порошкообразную массу и обладали плохой растворимостью в обычных органических растворителях, за исключением ДМФА и гексафторизопропанола.

Применение циклотетрафосфазена для темплат-полипептидного синтеза впервые было предложено нами [10]. В силу большего размера и большей гибкости фосфазенового кольца циклотетрамер представляет повышенный интерес для реакций комплексообразования с металлокомплексами и для формирования самособирающихся систем с нековалентным связыванием. В качестве функционального темплата было выбрано соединение II, полученное ранее [5], которое содержало симметрично чередующиеся заместители, однако его (*цис*-, *транс*-) конформеры определены не были. Тетрафенилтетрааминоциклотрифосфазен – реакционноспособное соединение с температурой плавления 225°C, хорошо растворимое в органических растворителях. Спектр ЯМР ^{31}P содержит синглет с хим. сдвигом $\delta = -3$ м. д., что соответствует полностью замещенному симметричному циклофосфазену.

Полимеризацию КА γ -бензилового эфира *L*- α -глутаминовой кислоты и КА *L*- α -аланина, инициированную первичными аминогруппами соединения II, и контроль за ходом реакций осуществляли в условиях, аналогичных описанным выше. Мольные соотношения мономер : инициатор для каждой растущей полимерной цепи составило 10 для γ -бензилглутамата и 10 для аланина.

ММ всех образцов находили методом ГПХ. Затруднение в определении ММ вызвали образцы, содержащие γ -метиловый эфир полиглутаминовой кислоты ($n = 20, 40$) на циклотрифосфазене

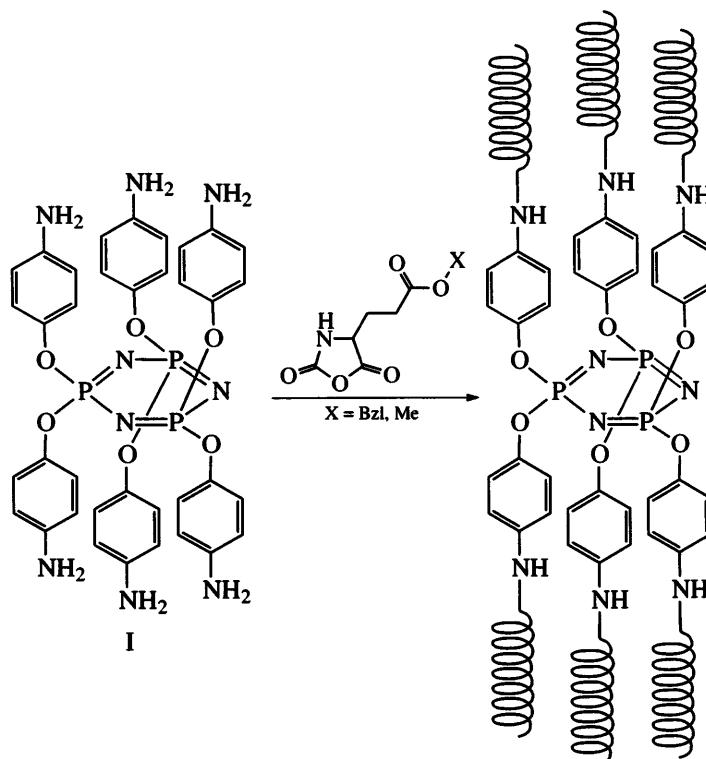
(Шб и Шв) и полиаланин ($n = 10$) на циклотетрафосфазене (IVб) ввиду их низкой растворимости в подвижной фазе. В остальных случаях расчетная ММ практически совпадала с экспериментальным значением, и полидисперсность образцов не превышала 1.3. Экспериментальное определение степени полимеризации каждой цепи не представлялось возможным, поэтому ее рассчитывали исходя из соотношения мономер: инициатор, исходя из числа функциональных групп в фосфазене.

Для всех синтезированных соединений были рассмотрены данные спектров кругового дихроизма в растворе и пленках, и ИК-Фурье спектроскопии в пленках и в виде таблеток, прессованных с КВг. Характер кривых в спектрах кругового дихроизма для соединения Ша, типичен для α -спиральных полиаминокислот. Так, мы наблюдали максимальное поглощение при 190 нм в положительной области и два минимума при 208 и 220 нм, что указывает на образование право-вращающих α -спиральных структур [11]. Рассмотрение спектров кругового дихроизма при различных температурах не дает какой-либо дополнительной информации о возможных конформационных переходах в растворах соединений Ша–Шв. Данные ИК-Фурье спектров подтверждают спиральный характер фрагментов ПАК. В спектрах соединения Ша присутствовали полосы поглощения валентных колебаний Амид I (1652 cm^{-1}) и Амид II (1548 cm^{-1}), свидетельствующих о предпочтительной спиральной конформации. В спектрах соединений Шб и Шв, γ -метилового эфира полиглутаминовой кислоты, иммобилизованного на циклотрифосфазене, наблюдали также слабое поглощение (в виде плеча) в области более низких частот: 1630 cm^{-1} (Амид I) и 1525 cm^{-1} (Амид II), что типично для β -складчатой структуры. Наличие этих слабых полос вызвано возможным существованием разных конформаций в твердом состоянии (в пленке).

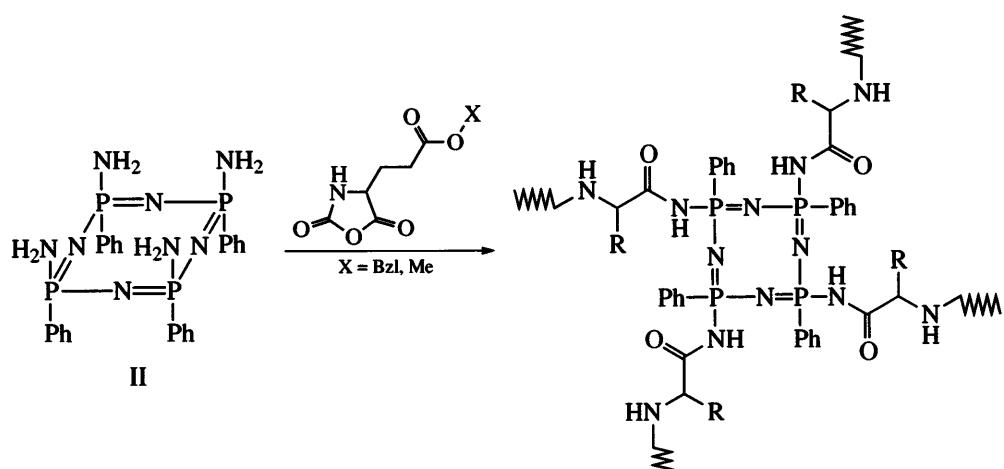
Иные данные были получены для полиаминокислот, полимеризованных на циклотетрафосфазеновом темплате. Спектр кругового дихроизма тетрафенилтетраамидолиаланина (IVб) (степень полимеризации 10) представлял собой кривую с максимумом при 195 нм и минимумом при 215 нм, характерным для β -складчатой конформации. Спектр кругового дихроизма γ -бензилового эфира полиглутаминовой кислоты, связанной с тетрафенилтетрааминоциклотетрафосфазеном (соединение IVа) показывал наличие неупорядоченной структуры, содержащей фрагменты различных конформаций. Сложный вид ИК-спектров, в частности, наличие слабых поглощений в

низкочастотных областях, также указывало на существование различных конформационных состояний у соединения IVa. Вероятно, в циклоТрифосфазене ввиду более жесткой структуры кольца и заранее заданной *транс*-конфигурации заместителей реализуется упорядоченная общая структура молекулы, где полиаминокислотные цепи стабилизируются в своей спиральной конформации за счет водородного межцепного внутримолекулярного связывания. Подобную архитектуру можно пред-

ставить как две связи из трех спиралей в *транс*-конфигурации относительно центрального трифосфазенового цикла. В то же время в поли- γ -бензилглутамате, полимеризованном на тетрафенилциклофосфазене, аминокислотные цепи находятся в неупорядоченном состоянии в отсутствие добавочного стабилизирующего фактора центрального фосфазенового кольца. Схематически строение полученных полимеров, аналогичное приведенному в работах [1, 7], показано ниже.



($X = \text{Bzl}$, $n = 10$ (IIIa); Me , $n = 20$ (IIIb); Me , $n = 40$ (IIIc)).



($R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOBzl}$ (IVa) и CH_3 (IVb)).

Таким образом, как наиболее благоприятные для дальнейшего изучения и превращений были выбраны соединение IIIa – поли- γ -бензилглутамат на циклотрифосфазене с общей степенью полимеризации $n = 48$ ($M_w = 11600$) и соединение IVa – поли- γ -бензилглутамат на циклотетрафосфазене с общей степенью полимеризации $n = 40$ ($M_w = 1.0 \times 10^4$). Наличие функциональных концевых аминогрупп в полимерных цепях производных циклофосфазенов открывает возможности для их дальнейших превращений. Первые шаги в этом направлении были предприняты при введении люминесцентных фрагментов в соединении IIIa, в частности, присоединение γ -(пиренил-1)пропионовой кислоты [12].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Inoue K., Itaya T. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 2001. V. 74. P. 1.
2. Majoral J.P., Caminade M. // Chem. Rev. 1999. V. 99. № 3. P. 858.
3. Inoue K., Miyahara A., Itaya T. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 6191.
4. Allcock H., Austin P., Rakowsky T. // Macromolecules. 1981. V. 14. P. 1622.
5. Голина С.И. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МХТИ им. Д.И. Менделеева, 1981.
6. Dorman L.C., Shiang W.R., Meyers P.A. // Synth. Commun. 1992. V. 22. P. 3257.
7. Inoue K., Sakai H., Ochi A., Itaya T., Tanigaki T. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 10783.
8. Marsh W. C., Trotter J. // J. Chem. Soc. A. 1971. P. 169.
9. Allcock H., Ngo D., Parvez M., Whittle R., Birdsall W. // J. Am. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 2628.
10. Popova G., Kireev V., Spitsyn A., Ihara H., Scherbinina M., Chvalun S. // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2003. V. 390. P. 91.
11. Alekperov D., Shirosaki T., Sakurai T., Popova G., Kireev V., Ihara H. // Polym. J. 2003. V. 35. № 5. P. 417.
12. Alekperov D., Shirosaki T., Sakurai T., Popova G., Kireev V., Ihara H. // Polym. Prepn. Jpn. 2002. V. 51. № 14. P. 3611.

Synthesis of Functional Poly(amino acids) on Cyclophosphazene Templates

G. V. Popova^a, D. A. Alekperov^a, T. Sakurai^b, H. Ihara^b, and V. V. Kireev^a

^a Mendeleev University of Chemical Technology,
Miusskaya pl. 9, Moscow, 125190 Russia

^b Kumamoto University, Kumamoto 850-8555, Japan

Abstract—With the use of hexakis(*p*-aminophenoxy)cyclotriphosphazene and tetraphenyltetraaminocyclotetraphosphazene whose primary groups initiated the polymerization of *L*- α -alanine and γ -esters of *L*- α -glutamic acid N-carboxyanhydrides, poly(amino acids) containing an inorganic central ring have been prepared. Polypeptide chains of various lengths have been obtained by varying the monomer-to-initiator molar ratio. The molecular masses of the synthesized samples are in good agreement with the calculated parameters, and the polymers show a narrow molecular-mass distribution ($M_w/M_n < 1.3$). The CD spectra and IR studies indicate a predominantly helical conformation of poly(amino acid) chains with the central triphosphazene ring and the disordered structure of poly(amino acid) chains bonded to cyclotetraphosphazene.