

고분자에 결합된 활성 에스테르에 의한 펩티드합성 III. 1-페닐-3-메틸-4-옥시미노피라졸 레진을 이용한 펩티드 합성에서 Spacer Arm의 효과

왕 영 · 이 윤 식

서울대학교 공과대학 공업화학과
(1992년 11월 7일 접수, 1993년 1월 18일 채택)

Peptide Synthesis with Polymer Bound Active Ester III. The Effect of Spacer Arm in Peptide Synthesis with 1-Phenyl-3-methyl-4-oximino pyrazole Resin

Young Wang and Yoon-Sik Lee

Dept. of Chem. Tech., College of Eng., Seoul National University, Seoul 152-742, Korea
(Received November 7, 1992, Accepted January 18, 1993)

요 약 : Aminomethyl레진을 chloromethyl레진(Merrifield레진)으로부터 또는 polystyrene레진을 직접 amidoalkylation하여 각각 합성하였다. 두 종류의 aminomethyl레진을 이용하여 5개의 ϵ -aminocaproic acid(ACA)가 차례로 커플링된 spacer arm을 가진 레진들을 각각 합성하였다. Chloromethyl레진으로부터 합성된 aminomethyl레진의 경우 ACA를 매번 커플링 할 때마다 25~30%의 유리 아미노기의 양이 감소하였으며, 직접 amidoalkylation에 의해 합성한 aminomethyl레진의 경우 매 커플링 단계 마다 3~5%의 유리 아미노기의 양이 감소하였다. 4-Nitroso-5-aminopyrazole 기능을 가진 레진은 직접 amidoalkylation하여 얻은 레진에 ACA를 spacer arm으로 커플링시켜 얻은 레진과 5-phenyl-7-methylpyrazole[4, 3-c][1, 2, 4]oxadiazin-3-one을 반응시켜 얻었다. 4-Nitroso-5-aminopyrazole 기능을 가진 레진을 이용하여 α -아미노기가 보호된 여러 가지 아미노산의 활성에스테르 레진들을 합성하였다. 4-Nitroso-5-aminopyrazole 기능을 가진 활성 에스테르 레진은 N-acylation 반응에 매우 뛰어난 반응성을 나타내었다. 또한 입체장애 효과 없이 아미노산 유도체의 종류에 거의 무관하게 아실화 반응이 일어났으며 90~96%의 수율로 펩티드들을 합성할 수 있었다. 얻어진 펩티드들은 NMR을 비롯한 여러 가지 물리적 방법으로 그 순도를 확인하였다.

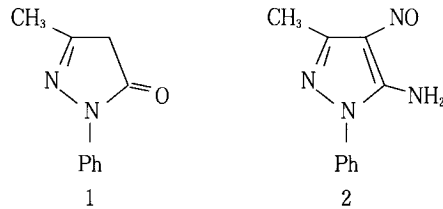
Abstract: Aminomethyl polystyrene resins were prepared either from chloromethyl-resin(Merrifield resin) or from direct amidoalkylation of polystyrene resin. Two kinds of aminomethyl resin were lengthened with spacer arms via sequential coupling of five ϵ -aminocaproic acids(ACA) respectively. In case of the resin prepared from the Merrifield resin, the amounts of free amino group of the resin were reduced by 25~30% after each coupling of ACA. But the one from direct amidoalkylation showed 3~5% loss after each coupling of ACA. 4-Nitroso-5-aminopyrazole resin was made by reacting ACA spacer arm resin, which was made from direct amidoalkylated resin, with 5-phenyl-7-methylpyrazole [4, 3-c][1, 2, 4]oxadiazin-3-one. Several polymeric active esters of N-blocked amino acids were prepared from the 4-nitroso-5-aminopyrazole bound resins. In anchoring step of the amino acid derivatives on the resin, no substantial effect of

bulkiness was found. 4-Nitroso-5-aminopyrazole bound active ester resins were found to be very reactive in N-acylation, The resulting peptides were obtained with 90~95% yield and characterized by NMR and other physical methods.

1. 서 론

Merrifield방법에 의한 전형적인 고체상 펩티드 합성 방법[1]과는 달리 고분자 지지체를 활성 에스테르로 이용한 펩티드 합성 방법은 레진이 아실기 운반체로서의 구실을 하게 되고 합성된 펩티드는 용액상으로 나오게 되어 크기가 비교적 작은 펩티드 합성에 알맞다.[2-5] 이 방법은 레진을 아실기 운반체로서 과량 사용할 경우 펩티드 합성 수율을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 반응이 끝난 후 간단한 여과 조작만으로도 거의 순수한 물질을 얻을 수 있다는 장점이 있다. 이렇게 얻은 펩티드 물질은 완전히 보호된 펩티드이기 때문에 α -아미노 보호기를 선택적으로 제거한 다음 다른 아실기 운반체 레진과 다시 반응시키거나 fragment condensation방법[6-8]에 의해 크기가 큰 펩티드 합성에 다시 이용할 수 있다. 아실기 운반체로서 레진이 펩티드 합성에 보다 효율적으로 쓰이기 위해서는 여러 가지 조건이 만족되어야 한다. 반응성이 커서 커플링 반응이 빠른 속도로 진행되어야 함은 물론 물리적인 안정성과 용매에 대한 팽윤성을 지녀야 한다. 또한 반응해야 하는 아미노산의 아민기와 정량적인 반응을 할 수 있기 위해서는 활성화된 에스테르기가 용매에 잘 노출되어야 하고, 아실화 반응에 대한 입체장애 등의 영향이 적어야 한다. 그동안 아실기 운반체로서의 레진에 대한 연구 동향은 전통적인 고체상 펩티드 분야와는 달리 비교적 활발하지 못하였는데, 최근 본 연구실에서는 비교적 반응성이 우수한 레진들을 합성하여 보고한 바 있다.[9-10] J. B. Kim 등은 피라졸론 유도체(1)를 레진에 고정화시킨 후 디펩티드를 합성하여 커플링 반응이 10~30분 안에 종결됨을 보여주었고, K. H. Lee 등은 피라졸 유도체(2)를 레진에 붙인 후 디펩티드를 합성하여 본 결과 커플링 반응성이 10분 이내에 종결됨을 알아내었다.(Scheme 1) 특히 피라졸 레진은 이제까지 문헌에 발표된 어느 아실기 운반체 레진보다도 가장 빠른 반응을 보여주었다. 그러나 아실화 반응시 Boc(또는 Z)-아미노산의 레진내 치환율이 비교적 낮았으며, 커플링 수율이 아미노산 에스테르의 종류에 따라 많은 영향을 받는 등 몇가지 개선되

어야 할 문제점이 발견되었다. 피라졸론 레진의 경우, 아미노산 유도체에 의한 레진의 아실화 반응 효율은 50~60% 이상 높힐 수 없었으며 나머지 피라졸론기는 아실화 반응에 참여할 수 없을 정도로 반응기 주위의 고분자 사슬에 의해 입체 장애를 받고 있음을 짐작할 수 있었다. 또한 레진의 아실화반응 효율은 아미노산 종류에 따라 약간씩의 차이를 보여 주었는데, 예를 들어 Z-Phe나 Boc-Phe의 경우 비교적 높은 아실화 반응 효율을 보여 주었는데 아마도 측쇄의 구조가 레진 사슬의 구조와 비슷하기 때문일 것이다. 또한 아실 레진의 커플링 반응에서도 넣어준 아미노산 에스테르의 종류에 따라 52%에서 98%까지의 수율 변화를 보여주었다. 이에 따라 본 연구에서는 아실기 운반체 레진으로서 위에서 언급한 제반 조건에 어느 정도 부합하고, 아미노산 종류에 따른 영향을 최소화하기 위하여 고분자 사슬과 피라졸 기능기 사이에 적당한 길이의 spacer arm을 도입하였으며, 펩티드 합성 반응에서 아실기 운반체로서의 레진 성능을 향상시키고자 하였다.



Scheme 1.

2. 실 험

2.1. 기기 및 시약

NMR spectrum은 Jeol JNM MH-100 NMR Spectrometer, IR spectrum은 Shimadzu IR 400 Spectrophotometer, 그리고 UV spectrum은 Shimadzu MPS-500을 사용하여 얻었다. 녹는점은 Yamato MP-21로 측정하였으며 보정은 하지 않았다. 원소분석은 Yanaco MP-21 CHN coder를 사용하였으며, optical rotation은 Jasco DIP-360으로 측정하였다. 사용한 모든 아미노산과 아미노산 유도체들은 L-형이었으며, 이들 중 Leu는 Hayashi사, Phe는 Chemical Dy-

namics사, Gly는 Santoku사, Val은 Fluka사 제품을 사용하였으며, Boc-Gly, Z-Phe는 잘 알려진 방법으로 합성하였고, Boc-Phe, Boc-Leu·H₂O는 Chemical Dynamics사 제품을 사용하였다. 아미노산 에스테르들은 합성하거나[11-12] Fluka사로부터 구입하여 사용하였다. 3-Aminocrotonitrile, DIEA, DCC, Merrifield 레진, polystyrene bead, potassium phthalimide는 Fluka사, phenylhydrazine, Boc-ε-aminocaproic acid는 Chemical Dynamics사, TFA, trifluoromethanesulfonic acid, N-(hydroxymethyl) phthalimide는 Aldrich사, Et₃N, hydrazine hydrate는 Junsei사 제품을 사용하였다. CH₂Cl₂, TFA는 P₂O₅로, DMF, DIEA, pyridine은 ninhydrin으로, 알콜은 CaH₂ 또는 BaO로써 정제하였으며, 그 밖의 모든 유기용매는 일급 시약을 사용하였다.

2.2 분석방법

Picric Acid Titration[13]

레진내의 유리 아미노기의 농도를 알기 위해 분석용 glass filter(용량 3ml)에 레진을 약 20mg을 넣고, CH₂Cl₂(3×2min), 5% DIEA/CH₂Cl₂(2×3min), CH₂Cl₂(3×2min), 0.1M picric acid/CH₂Cl₂(2×5min), CH₂Cl₂(5×2min)의 순서대로 처리해 레진의 유리 아미노기가 picrate를 형성하도록 하였다. 이것을 5% DIEA/CH₂Cl₂(2×3min), CH₂Cl₂(3×2min)로 처리하여 DIEA picrate를 모은 후 95% EtOH로 희석하여 358nm(ε=14500)의 UV spectrum을 얻어 유리 아미노기의 농도를 측정하였다.

Ninhydrin Color Test[14]

레진내 커플링 반응하지 않고 남아 있는 유리 아미노기의 존재를 확인하기 위해 (1) 500mg의 ninhydrin을 10ml에 에탄올에 녹인 용액, (2) 80mg의 페놀을 20ml의 에탄올에 녹인 용액, (3) 2ml의 0.01M KCN을 10ml의 피리딘으로 희석한 용액을 각각 준비하였다. 레진(10~20mg)을 담은 시험관에 위 각 용액들을 한 두 방울씩 떨어뜨려 물증탕으로 5분 동안 100°C로 가열하여 레진의 색이 변하지 않거나 노란 색이면 99.4% 이상이 커플링이 일어난 것으로 간주하였다.

Volhard 법에 의한 염소정량[15]

Cl⁻의 양을 정량하고자 하는 레진(100~150mg)

을 피리딘 3ml와 함께 시험관에 넣고 100°C에서 두 시간 동안 가열하였다. 이것을 삼각플라스크에 옮긴 후, 50% 아세트산 30ml와 진한 질산 5ml를 가하였다. 이 용액 10ml를 약 10ml의 물이 들어 있는 삼각플라스크에 넣고, ferric alum 지시약과 표준질산은 용액 10ml를 교반하면서 서서히 가한 후 5분 동안 방치시켰다. 물 50ml와 톨루엔 10ml를 가한 후 잘 섞이도록 교반하면서 표준 NH₄SCN 용액으로 얻은 적갈색 빛이 나타날 때까지 적정하였다.

레진에 결합된 아미노산의 정량[16]

레진에 결합된 아미노산 유도체의 치환율을 결정하기 위하여 (1) a) 약 12M HClO₄ 수용액 0.17ml를 넣은 90ml 아세트산과 10ml Ac₂O를 24시간 동안 방치한 용액, b) 0.2% crystal violet/AcOH 지시약, c) 0.1M 벤질아민/톨루엔 용액을 각각 준비하였으며, HClO₄/AcOH 용액은 N, N'-diphenylguanidine으로 그 농도를 결정하였다. 아미노산-레진(아실레진)(30~40mg)을 삼각플라스크에 넣고 벤질아민용액을 가하여 5분 동안 반응시켰다. 여기에 crystal violet 지시약을 넣고 HClO₄/AcOH 용액을 가하여 보라색에서 녹색으로 변할 때까지 미 반응 벤질아민을 적정하였다. 소비된 HClO₄/AcOH 용액의 부피로부터 레진에 결합된 아미노산 유도체의 치환율을 측정하였다.

(2) 아미노산-레진에 벤질아민을 가하여 5분 동안 반응시킨 후 5% 구연산과 물로 세척하고 MgSO₄로 건조시킨 후 회전 증발시켜 아미노산 벤질아미드의 고체를 얻어 이 물질의 질량을 측정하여 레진에 결합된 아미노산 유도체의 치환율을 간접적으로 측정하였다.

2.3 합 성

2.3.1. 피라졸 유도체의 합성

1-Phenyl-3-methyl-5-aminopyrazole(PMAP)

3-Aminocrotonitrile(25g, 295mmol)과 phenylhydrazine(35ml, 355mmol)을 에탄올에서 50시간 동안 환류시킨 후 감압 회전 증발시켜 얻은 고체를 벤젠에서 결정화시켰다. 벤젠에서 재결정하여 흰색의 침상을 얻었다. Yield 38.2g(75%); mp 110~111°C; TLC Rf 0.6(CHCl₃:MeOH=15:1); NMR(CDCl₃) δ 2.25(s, 3H), 3.85(broad, 2H), 5.4(s, 1H), 7.2-7.6(m, 5H). Anal. Calcd. for C₁₀H₁₁N₃(173.22): C 69.34; H 6.40; N 24.26%. Found: C 69.64; H 6.51; N 23.84%.

1-Phenyl-3-methyl-4-nitroso-5-aminopyrazole (PMNAP)

PMAP(15g, 87mmol)를 1N 염산수용액 110ml에 녹인 후 얼음중탕에서 교반을 하면서 NaNO_2 (7.8g, 113mmol)용액을 천천히 적가하였다. NaNO_2 용액을 적가함에 따라 용액의 색이 흰색에서 적갈색으로 변하였으며 생성물이 침전으로 떨어졌다. 약 2시간 동안 적가하고 1시간 동안 더 교반한 후 여과하였다. 물로써 여러번 세척하고 진공 건조시켰다. 클로로포름에서 재결정하여 적색 결정을 얻었다. Yield 12.1g (69%); mp 200~201°C; TLC Rf 0.73(CHCl_3 : MeOH=5:1); NMR(CDCl_3) δ 2.85(s, 3H), 7.15 (broad, 2H), 7.4~8.0(m, 5H). Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$ (202.21): C 57.89; H 3.53; N 24.55%. Found: C 58.15; H 3.53; N 24.04%.

5-Phenyl-7-methylpyrazole[4,3-c][1,2,4]oxadiazin-3-one(PMPO)

PMNAP(3g, 15mmol)를 CH_2Cl_2 (100ml)에 녹여, 얼음중탕에서 DIEA(2.85ml, 16mmol)와 ethyl chloroformate(1.65ml, 16mmol)를 교반하면서 가하였다. 얼음중탕에서 1시간 동안, 상온에서 약 38시간 동안 교반시킨 후 감압 회전 증발시켰다. 에틸에테르를 가하여 DIEA·HCl 염을 침전시킨 후 여과하여 제거하였으며, 여액을 감압회전 증발시켜 녹색의 오일을 얻었다. 오일을 벤젠에 녹여 밤새 환류시켰다. 벤젠을 감압 회전 증발시키고 에틸 아세테이트-석유 에테르로 결정화시켜 적색의 고체를 얻었다. Yield 2.0g(59%); mp 148~150°C; TLC Rf 0.63(CHCl_3 : MeOH=25:1); NMR(CDCl_3) δ 2.65(s, 3H), 7.4~8.4(m, 5H). Anal. Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2$ (228): C 57.89; H 3.53; N 24.55%. Found: C 58.15; H 3.53; N 24.04%.

2.3.2. 고분자 지지체의 합성

Phthalimidomethylpolystyrene(레진 1)

1% 디비닐벤젠이 가교된 chloromethylpolystyrene(Merrifield 레진)(20g, 1.5mmol/g resin)을 정제된 DMF에 현탁시킨 후 potassium phthalimide(6.6g, 36mmol)를 가하여 50°C에서 40시간 동안 교반시켰다. 레진을 소량 취하여 DMF, MeOH, H_2O MeOH 순서로 잘 세척하였다. IR(KBr pellet), 1710, 1775 cm^{-1} (C=O stretching peak). Chloride Anal. < 0.03meq Cl^- /g resin.

Phthalimidomethylpolystyrene(레진 2)

기계식 교반기가 장착된 3구 둥근 바닥 플라스크에 50% TFA/ CH_2Cl_2 (100ml)를 넣고 1% 디비닐벤젠이 가교된 polystyrene(Bio Bead S-X1)(10g)과 N-(hydroxymethyl) phthalimide(6g, 5.7mmol)를 가한 후 trifluoromethanesulfonic acid(TFMSA)(4ml, 130mmol)용액을 천천히 적가시켰다. 약 48시간 후 반응을 종결시키고 50% TFA/ CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 , EtOH 순서로 잘 세척한 후 건조시켰다. IR(KBr pellet), 1710, 1775 cm^{-1} (C=O stretching peak). Anal. N: 2.35%(1.68mmol/g resin).

Aminomethylpolystyrene(레진 A)

레진 1과 hydrazine hydrate(3ml)를 무수 에탄올(150ml)에 넣은 후 약 20시간 동안 환류시켰다. 레진 일부를 취한 다음 IR로 1710, 1775 cm^{-1} band가 없음을 확인하고 레진을 hot EtOH, 5% KOH 수용액, H_2O , EtOH 순서로 잘 세척하였다. Anal. N: 2.1%(1.5mmol/g resin). Picric Acid Anal. 1.4mmol/g resin).

Phthalimidomethylpolystyrene(레진 B)

레진 2와 hydrazine hydrate(2.5ml)를 위와 같은 방법으로 처리하였다. Picric Acid Anal. 2.0mmol/g resin.

ϵ -Aminocaproic Acid(ACA)-Spacer Arm 레진

펩티드 합성용기에 레진 A 또는 레진 B 를 넣고 CH_2Cl_2 (10ml/g resin)를 가하여 팽윤시켰다. Boc- ϵ -aminocaproic acid(5 당량)를 넣고, DCC(5 당량)을 CH_2Cl_2 에 녹여 가하였다. 약 4시간 반응시킨 후 레진 일부를 취하여 ninhydrin test 결과 커플링이 끝났음을 확인하고 MeOH, CH_2Cl_2 로 잘 세척하였다. Method A의 경우 25% TFA/ CH_2Cl_2 용액으로 1분간 레진을 전처리한 후 25% TFA/ CH_2Cl_2 용액을 가하여 30분 동안 흔들어 주어 Boc-group을 제거했으며, Method B의 경우 Boc-group을 제거하기 전에 10% Ac_2O /pyridine으로 30분간 처리하여 주었다. Boc-group을 제거한 후 CH_2Cl_2 , 5% DIEA/ CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 용액으로 잘 세척하였다. 위와 같은 과정을 되풀이하여 ϵ -ACA-spacer arm을 차례로 5개 커플링시켰다. Picric Acid Anal. Resin A (Method A, 0.20mmol / g resin; Method B, 0.52mmol / g resin); Resin B (Method B, 0.8mmol/g resin).

Glycine-Spacer Arm 레진

펩티드 합성용기에 레진 A (2g, 1.4mmol/g resin)를 넣고 CH_2Cl_2 를 가하여 팽윤시켰다. Boc-Gly(1.47g, 8.4mmol)을 넣고, DCC(1.8g, 8.4mmol)를 CH_2Cl_2 에 녹여 가하였다. 위와 같은 방법으로 반응 반복하여 glycine-spacer arm을 차례로 5개 커플링 시켰다.

피라졸 유도체를 지닌 ϵ -ACA-Spacer Arm 레진(Resin I)

펩티드 합성용기에 레진 B(Method B)로부터 합성한 ϵ -ACA-Spacer arm 레진(8g, 0.8mmol/g)을 넣고 CH_2Cl_2 에 팽윤시킨 다음 PMPO(2.92g, 13mmol)를 넣어 약 24시간 동안 반응시켰다. 레진을 여과하고, MeOH, CH_2Cl_2 로 잘 세척한 다음 10% Ac_2O /pyridine 용액으로 10분간 처리하여 미 반응 아미노기를 아실화 시킨 후 벤질아민으로 5분 동안 처리하여 욱심기로 바꾸어 주었다.

아미노산이 결합된 피라졸 레진(Resin II)

위에서 합성한 Resin I 과 2당량의 Boc(or Z)-아미노산, 2.1당량의 DCC를 가한 후 6시간 동안 반응시켰다. 레진 bead의 색은 녹색에서 붉은색으로 변하였다. CH_2Cl_2 , MeOH/ CH_2Cl_2 (1:1), CH_2Cl_2 순서로 3번씩 잘 세척 후 건조시켰다. 치환율, 0.48mmol/g resin(Boc-Phe-Resin II), 0.50mmol/g resin(Boc-Leu-Resin II), 0.48mmol/g resin(Boc-Gly-Resin II), 0.52mmol/g resin(Z-Phe-Resin II)

2.3.3. 피라졸 레진(Resin II)을 이용한 펩티드 유도체의 합성N-t-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanylglycine-4-(methylthio) phenyl ester(Boc-Phe-Gly-OMTP)

Boc-Phe-Resin II (2g, 0.48mmol/g resin)를 CH_2Cl_2 에 팽윤시키고 HCl·Gly-OMTP(212mg, 0.91mmol)를 당량의 DIEA로 중화시킨 용액을 가하여 흔들어서 주었다. 10분 후 반응 혼합액을 여과하고, CH_2Cl_2 로 레진을 세척하고 여과액을 모았다. 이를 5% 구연산과 물로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조시킨 다음 회전증발시켜 고체를 얻었다. 에틸 아세테이트-석유 에테르에서 재결정화시켜 흰색의 결정을 얻었다. Yield 372mg(92%); mp 150~151°C; TLC Rf 0.80(CHCl_3 :MeOH=15:1); NMR(CDCl_3) δ 1.4(s, 9H), 2.5(s, 3H), 3.0(m, 2H), 4.1(d, 2H), 4.4(m, 1H), 5.1(m, 1H), 6.7(broad, 1H), 7.1(m, 9H); $[\alpha]_D^{25}$ -12.2° (c=1.0, CHCl_3), Anal. Calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (444.

54): C 62.14; H 6.35; N 6.30%. Found: C 62.25; H 6.32; N 6.28%.

N-t-Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanylglycine benzyl ester(Z-Phe-Gly-OBzl)

Z-Phe-Resin II(2g, 0.52mmol/g resin)와 TsOH·Gly-OBzl(331g, 0.98mmol)을 사용하여 동일한 방법으로 10분 동안 반응시켜 고체를 얻었다. 에틸 아세테이트-석유 에테르에서 재결정화시켜 흰색의 결정을 얻었다. Yield 403mg(92%); mp 130~131°C; TLC Rf 0.70(CHCl_3 :MeOH=15:1); NMR(CDCl_3) δ 3.1(d, 2H), 4.05(d, 2H), 4.6(m, 1H), 5.13(s, 1H), 5.22(s, 2H), 5.65(d, 1H), 6.8(m, 1H), 7.2~7.6(m, 15H). $[\alpha]_D^{25}$ -25.2° (c=0.4, MeOH), Anal. Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$ (446.50): C 69.94; H 5.87; N 6.27%. Found: C 70.02; H 5.80; N 6.32%.

N-t-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucine benzyl ester(Boc-Phe-Leu-OBzl)

Boc-Phe-Resin II(2g, 0.48mmol/g resin)와 TsOH·Leu-OBzl(358g, 0.91mmol)을 사용하여 10분 동안 반응시켜 고체를 얻었다. 에틸 아세테이트-석유 에테르에서 재결정화시켜 흰색의 결정을 얻었다. Yield 380mg(89%); mp 81~82°C; TLC Rf 0.80(CHCl_3 :MeOH=15:1); NMR(CDCl_3) δ 0.9(m, 6H), 1.4(s, 9H), 1.7(m, 3H), 3.1(d, 2H), 4.4(m, 1H), 5.1(broad, 1H), 5.25(s, 2H), 6.5(broad, 1H), 7.2~7.6(m, 10H). $[\alpha]_D^{25}$ -24.9° (c=1.0, MeOH), Anal. Calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$ (468.59): C 69.21; H 7.74; N 5.98%. Found: C 69.20; H 7.70; N 6.05%.

N-t-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanylglycine methyl ester(Boc-Phe-Gly-OMe)

Boc-Phe-Resin II(2g, 0.48mmol/g resin)와 HCl·Gly-OMe(311g, 0.98mmol)을 사용하여 동일한 방법으로 10분 동안 반응시켜 고체를 얻었다. 에틸 아세테이트-석유 에테르에서 재결정화시켜 흰색의 결정을 얻었다. Yield 294mg(96%); mp 82~83°C; TLC Rf 0.55(CHCl_3 :MeOH=15:1); NMR(CDCl_3) δ 1.4(s, 9H), 3.2(m, 2H), 3.8(s, 3H), 4.1(d, 2H), 4.6(q, 1H), 5.5(d, 1H), 7.1(broad, 1H), 7.5(m, 5H). $[\alpha]_D^{25}$ -1.4° (c=1.0, MeOH), Anal. Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ (336.39): C 60.70; H 7.19; N 8.33%. Found: C 60.97; H 7.49; N 8.56%.

N-t-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanylglycine benzyl ester (Boc-Phe-Gly-OBzl)

Boc-Phe-Resin II (2g, 0.48mmol/g resin)와 TsOH·Gly-OBzl(307g, 0.91mmol)을 사용하여 동일한 방법으로 10분 동안 반응시켜 고체를 얻었다. 에틸 아세테이트-석유 에테르에서 재결정화시켜 흰색의 결정을 얻었다. Yield 345mg(92%); mp 132~134°C; TLC Rf 0.61(CHCl₃:MeOH=15:1); NMR (CDCl₃) δ 1.4(s, 9H), 3.1(m, 2H), 4.1(d, 2H), 4.5(q, 1H), 5.2(d, 1H), 5.3(s, 2H), 6.8(broad, 1H), 7.5-7.6(m, 10H). [α]_D²⁵ -4.0° (c=1.0, CHCl₃). Anal. Calcd. for C₂₇H₃₆N₂O₅(412.48): C 66.97; H 6.84; N 6.79%. Found: C 70.30; H 6.85; N 6.79%.

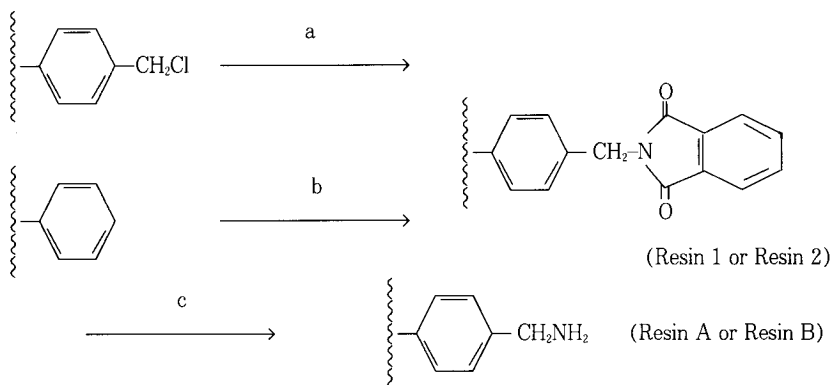
N-t-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucine methyl ester (Z-Phe-Leu-OMe)

Z-Phe-Resin II (2g, 0.52mmol/g resin)와 TsOH·Leu-OMe(311mg, 0.91mmol)을 사용하여 동일한 방법으로 10분 동안 반응시켜 고체를 얻었다. 에틸 아세테이트-석유 에테르에서 재결정화시켜 흰색의 결정을 얻었다. Yield 376mg(90%); mp 101~103°C; TLC Rf 0.71(CHCl₃:MeOH=15:1); NMR (CDCl₃) δ 0.9(m, 6H), 1.5(m, 3H), 3.1(d, 2H), 3.75(s, 3H), 4.4(m, 1H), 4.7(m, 1H), 5.15(s, 2H), 5.6(d, 1H), 6.6(d, 2H), 7.1-7.6(m, 15H). [α]_D²⁵ -25.5° (c=3.1, MeOH). Anal. Calcd. for C₂₄H₃₀N₂O₅

(468.59): C 69.21; H 7.74; N 5.98%. Found: C 69.15; H 7.75; N 6.05%.

3. 결과 및 고찰**3. 1. Aminomethyl 레진의 합성**

Spacer arm을 붙일 aminomethyl레진은 잘 알려져 있는 방법(Scheme 2)에 따라 1% 디비닐벤젠이 가교된 chloromethylpolystyrene bead(Merrifield 레진) 또는 polystyrene bead로부터 출발하여 각각 합성하였다. Merrifield레진을 출발물질로 한 경우에는 polystyrene의 chloromethyl기를 potassium phthalimide와 반응시켜 phthalimidomethyl레진을 합성하였고, Volhard법[15]으로 정량하여 잔존염소의 양이 0.03meq/g resin 이하임을 확인한 후 다음반응을 진행시켰다. Polystyrene을 출발물질로 한 경우 phthalimidomethyl기를 강산 존재 아래 polystyrene에 직접 도입시켰으며[17], 치환율은 N-(hydroxymethyl)phthalimide와 trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA)의 양으로써 조절할 수 있었다. 각각의 반응의 진행 정도는 phthalimide 고리의 특성 peak인 1710, 1775cm⁻¹에서의 C=O stretching band의 존재 유무로써 확인하였다. Aminomethyl레진의 최종치환율은 N 원소분석 결과 또는 picric acid[12]로 정량하여 계산하였다.



*Potassium phthalimide, DMF, 50°C; ^b50% TFMSA/TFA, N-hydroxymethylphthalimide; ^cNH₂NH₂·H₂O, EtOH, reflux

Scheme 2.

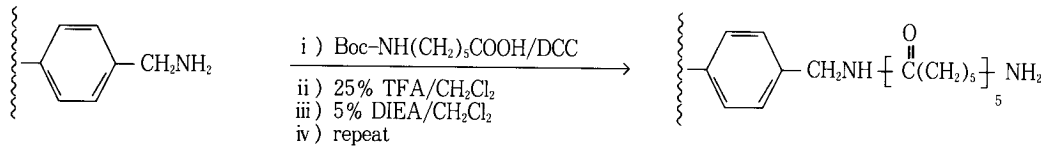
3.2. Aminomethyl레진과 spacer arm의 결합 반응

3.2.1. ϵ -Aminocaproic acid(ACA)의 결합

Aminomethyl레진에 5개의 ACA를 spacer arm으로 커플링 하는 과정은 일반 고체상 합성 방법을 따랐다(Scheme 3). 매 커플링 반응이 종결됨을 확인한 후, Boc-group을 제거하고 레진의 일부를 취하여 다음 커플링 반응에 참여 할 수 있는 아미노기의 양을 picric acid titration방법으로 측정하였다. 매 커플링 반응이 끝난 후 계산된 다음 반응에 참여할 수 있는 각 아미노기 양들을 이상적인 경우, 즉 100% 반응이 일어났다고 가정한 경우의 양과 비교하여 Table 1에 나타내었다. Merrifield레진으로부터 합성된 aminomethyl레진(레진 A)의 경우를 우선 살펴보면 매 커플링 반응 후 레진을 Ac_2O /pyridine으로 아세틸화시킨 경우(Method A)와 그렇지 않은 경우(Method B) 레진내 아미노기의 손실율에 커다란 차이를 보여주고 있다. 즉 아세틸화반응이 생략된 경우에는 커플링 반응 후 다음 반응에 참여 가능한 유리 아미노기의 양이 첫 번째 커플링 반응(6.6%)을 제외하고 매번 26~30% 씩 감소하였으며, Ac_2O /pyridine으로 처리하여 아세틸화시킨 경우에는 매번 6~10%씩 감소하였음을 보여 주고 있다. 고체상 펩티드 합성시 매 커플링 cycle 후 유리 아미노기의 절대량이 감소되는 메카니즘은 chloromethyl레진 합성중에서 반응으로 레진내에 남게 되는 hydroxymethyl기에 의한 trifluoroacetylation 메카니즘으로 설명되어진 바 있다.[18-20](Fig. 1). 상업적으로 시판되고 있는

Merrifield레진에는 chloromethyl기에 대해서 약 40% 정도의 hydroxymethyl기가 레진내 존재한다고 알려져 있으며[18], TFA를 사용하여 Boc-group을 제거할 때 레진내에 잔존하는 TFA와 hydroxymethyl기 사이에 형성된 trifluoroacetoxymethyl기는 중화 단계 후 생성된 유리 아미노기의 공격을 받아 매우 안정한 trifluoroacetamide를 형성한다. 그리고 hydroxymethyl기는 재생되어 다음 합성 단계에서 동일한 부 반응을 일으키기 때문에 유리 아미노기의 절대량은 계속 감소하게 되어 5번의 ACA 커플링 반응을 거치는 동안 커플링 반응에 참여할 수 없는 아미노기의 양은 전체 유리 아미노기의 약 74%에 이르게 된다. 그러나 매 커플링 단계 후 반응에 참여하지 않는 hydroxymethyl기를 아세틸화 시켜 준 경우(Method B), 형성된 acetoxymethyl기는 trifluoroacetoxymethyl기보다 안정한 에스테르이므로 중화 단계에서 유리된 아미노기에 의해 공격받기 어렵기 때문에 총 유리 아미노기의 손실이 약 45% 정도에 머물게 되는 것이다.

한편 polystyrene으로부터 직접 amidoalkylation 반응시켜 aminomethyl레진(레진 B)을 합성하고 이를 이용하여 ACA spacer arm레진을 합성한 경우 레진내에 hydroxymethyl기가 존재하지 않음으로 앞에서 언급한 부 반응이 일어나지 않기 때문에 매 커플링 반응 후 약 3~5% 정도의 유리 아미노기 손실밖에는 없었으며 비교적 부반응이 적었기 때문에 피라졸 레진 합성에는 이 방법을 따랐다.



Scheme 3.

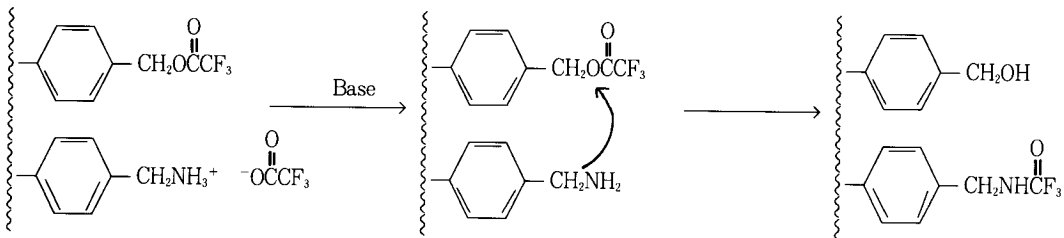


Fig. 1. Mechanism of trifluoroacetylation of resin-bound amines during the neutralization step of solid-phase peptide synthesis.

Table 1. Amount of Free Amino-Group after Each Coupling Reaction between Aminomethyl-Resin and Boc- ϵ -Aminocaproic Acid^a

Resin	Coupling Method	No. of Spacer Arm					
		0	1	2	3	4	5
Resin A ^b	Ideal ^d	1.4	1.21	1.06	0.95	0.86	0.78
	Method A ^e	—	1.05(13)	0.65(27)	0.41(30)	0.28(28)	0.20(26)
	Method B ^f	—	1.13(6.6)	0.91(9.0)	0.75(9.1)	0.62(10.2)	0.52(9.5)
Resin B ^c	Ideal ^d	2.0	1.63	1.38	1.19	1.05	0.94
	Method B ^f	—	1.58(3.0)	1.29(3.7)	1.09(3.5)	0.94(4.1)	0.80(4.5)

^aNumbers in () indicate % of loss of free amino group after each coupling reaction. ^bAminomethyl-resin prepared from commercial chloromethyl-polystyrene resin (Deg. of substitution : 1.4mmol/g resin). ^cAminomethyl-resin prepared from polystyrene resin by direct amidoalkylation (Deg. of substitution : 2.0mmol/g resin), ^dIdeal degree of substitution after each coupling reaction. ^eDegree of substitution after each coupling reaction without after treatment of Ac₂O/pyridine. ^fDegree of substitution after each coupling reaction with after treatment of Ac₂O/pyridine.

3. 2. 2. Glycine의 결합

Glycine과 같이 단위 길이가 작은 아미노산 spacer arm의 경우에는 spacer arm의 갯수를 증가시킬 때 어떤 현상이 일어나는지 알아보기 위하여 glycine-spacer arm레진을 합성하였다. Glycine-spacer arm 레진의 경우 ϵ -ACA-spacer arm 레진과 달리 매 커플링 후 치환율의 감소 비율이 비교적 적었으며, Ac₂O/pyridine으로 처리 한 경우와 안 한 경우의 차이점이 적은 것으로 나타났다(Table 2). 이것은 polystyrene bead내에서 일어나는 trifluoroacetylation반응이 유리 아미노기에 의한 친핵성 반응이므로 glycine의 α -아미노기의 친핵성이 ϵ -ACA, ϵ -아미노기

보다 작기 때문일 것으로 생각된다. 즉 ϵ -ACA-spacer arm레진의 경우에는 ϵ -아미노기의 친핵성이 커서 trifluoroacetylation반응 속도가 빨라지게 되므로 유리 아미노기의 감소율이 크고, glycine-spacer arm레진의 경우에는 α -아미노기의 친핵성이 작기 때문에 trifluoroacetylation반응 속도가 느려서 유리 아미노기의 감소율이 적은 것으로 생각된다. 또한 glycine-spacer arm 레진의 경우에는 trifluoroacetylation반응이 친핵성이 작은 α -아미노기에 의한 친핵성 반응이므로 아세틸화반응을 한 경우와 안 한 경우 사이에 큰 차이점이 없는 것으로 생각되어 진다.

Table 2. Amount of Free Amino-Group after Each Coupling Reaction between Aminomethyl-Resin and Boc-Glycine^a

Resin	Coupling Method	No. of Spacer Arm					
		0	1	2	3	4	5
Resin A ^b	Ideal ^c	1.4	1.29	1.20	1.13	1.06	1.00
	Method A ^d	—	1.25(3.1)	1.11(5.1)	0.99(4.8)	0.89(5.3)	0.80(6.1)
	Method B ^e	—	1.25(3.1)	1.13(3.4)	1.03(2.9)	0.94(3.2)	0.86(3.4)

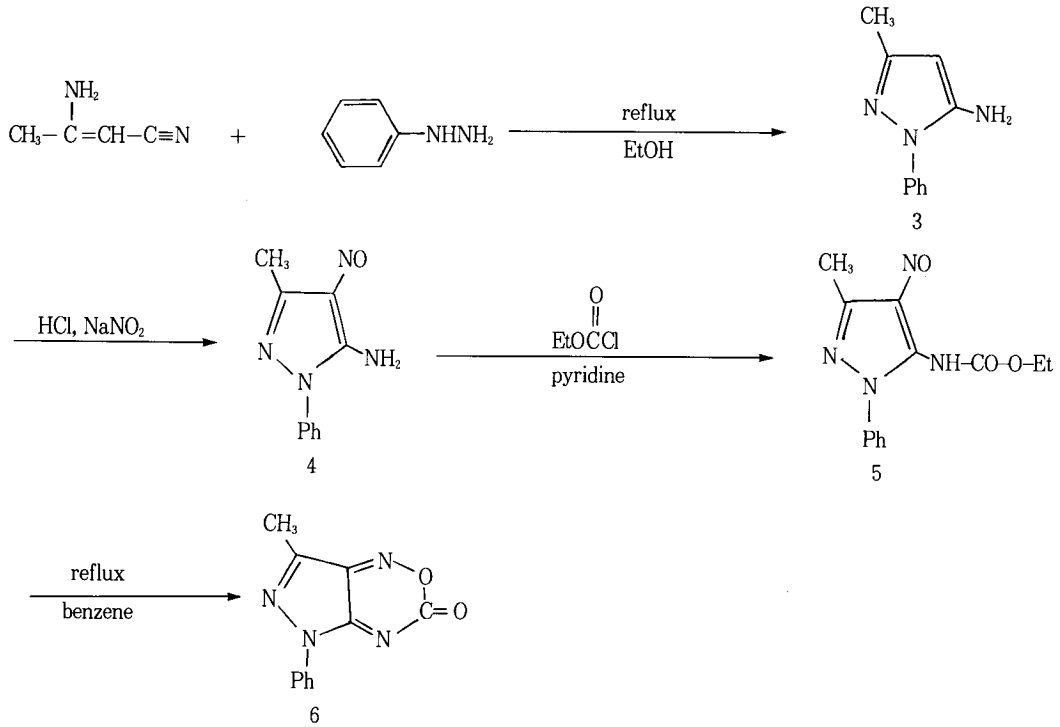
^aNumbers in () indicate % of loss of free amino group after each coupling reaction. ^bAminomethyl-resin prepared from commercial chloromethyl-polystyrene resin (Deg. of substitution : 1.4mmol/g resin). ^cDegree of substitution after each coupling reaction without after treatment of Ac₂O/pyridine. ^dDegree of substitution after each coupling reaction with after treatment of Ac₂O/pyridine.

3. 3. Pyrazole레진을 이용한 펩티드 합성

3. 3. 1. 피라졸 유도체의 합성

Taylor의 합성법[21]에 따라 3-aminocrotonitrile

과 phenylhydrazine을 환류시켜 1-phenyl-3-aminopyrazole(PMAP)(3)을 75% 수율로 합성하였다. 3으로부터 니트로소화 반응을 시켜 붉은 색의 1-phenyl



Scheme 4.

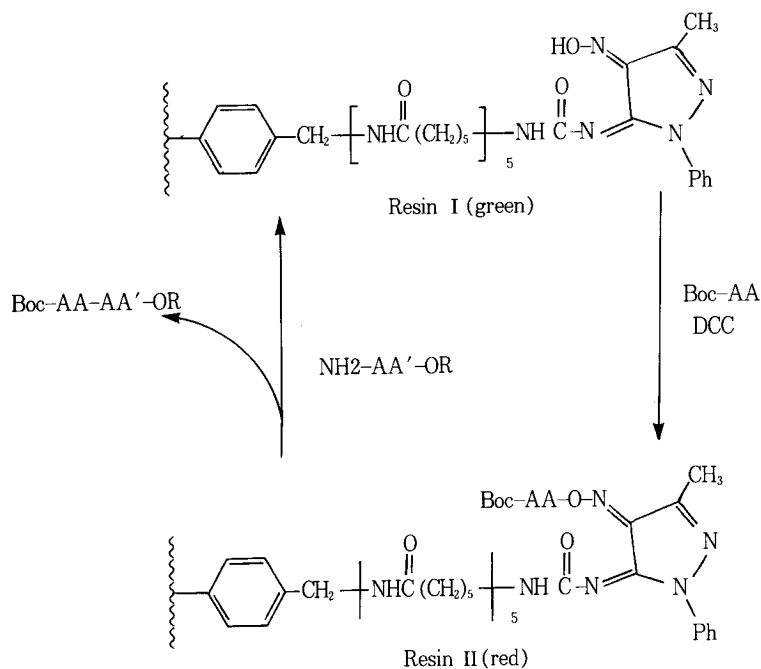
-3-methyl-4-nitroso-5-aminopyrazole(PMNAP)(4)을 69% 수율로 얻었다. 4를 1당량의 ethyl chloroformate와 반응시켜 녹색 오일인 1-phenyl-3-methyl-5-(ethoxycarbonylamino)-pyrazole(5)을 얻었으며, 이를 벤젠에서 환류시킨 후 결정화하여 붉은 색의 5-phenyl-7-methylpyrazole[4,3-c][1,2,4]oxadiazin-3-one(PMPO)(6)을 59% 수율로 얻었다. [22] 전 합성 과정은 Scheme 4에 나타내었다.

3.3.2. 피라졸 레진의 합성

ϵ -ACA가 5개 붙어있는 치환율 0.8mmol/g resin인 레진과 6을 반응시켜서 녹색의 레진(Resin I)을 합성하였고, N 원소 분석 결과 커플링 수율은 약 95%이었다. 미반응의 아미노기를 아실화 시키기 위하여 10% Ac_2O /pyridine용액으로 처리하였으며, 이때 아실화된 옥심기로부터 옥심 형태의 레진으로 바꾸어 주기 위해 벤질아민을 가했다[9]. 이때 레진의 증가된 질량으로 계산한 기능기의 치환율은 0.68mmol/g resin이었다.

3.3.3. 피라졸 레진을 이용한 펩티드의 합성

아미노기가 보호된 각종 아미노산 유도체를 DCC를 이용해 피라졸 레진(Resin I)에 결합시켰다. 반응이 진행됨에 따라서 레진 색이 녹색에서 적색(Resin II)으로 변해갔다.(Scheme 5) 레진에 결합된 아미노산 유도체의 치환율은 Resin II에 벤질아민을 가해 얻어진 아미노산 벤질아미드의 양으로 부터 계산한 결과 0.48~0.52mmol/g resin으로 아미노산 종류에 관계 없이 거의 비슷한 값을 가짐을 알 수 있었다(Table 3). 이것은 피라졸 기능기가 레진 사슬에서 멀리 떨어져 있어서 아미노산 유도체의 크기, 레진 사슬의 소수성 등에 영향을 덜 받는 것으로 생각된다. 이렇게 준비한 Resin II와 Gly-OMe, Gly-OMTP, Gly-OBzl, Leu-OMe, Leu-OBzl, Val-OMe, Phe-OMe 등 아미노산 에스테르와 반응시켜 디펩티드 유도체들을 손 쉽게 얻을 수 있었다. 이때 색 변화로부터 모든 반응들은 수분내에 거의 종결되었음을 알 수 있었으며, 10분이 지난 후 레진을 거르고 세척하여 각각의 디펩티드들을 회수하였다. 합성된 각각



Scheme 5.

Table 3. The Result of Boc(or Z)-AA-Resin II^a

Resin	Deg. of Substitution(mmol/g resin)
Boc-Phe-Resin II	0.48
Boc-Leu-Resin II	0.50
Boc-Gly-Resin II	0.48
Z-Phe-Resin II	0.52

^aDeg. of Substitution of pyrazole group : 0.68mmol/g resin.

Table 4. Peptide Derivatives Obtained From Boc(or Z)-AA-Resin II

Peptide	Reaction Time(min)	Yield (%)	MP. (°C)	$[\alpha]_D^{25}$ (C, Solvent, °C)
Boc-Phe-Gly-OMe	10	96	91	-1.40(1.0, MeOH, 25)
Boc-Phe-Gly-OMTP	10	92	150~151	-12.2(1.0, CHCl ₃ , 25)
Boc-Phe-Gly-OBzl	10	92	132~134	- 4.0(1.0, CHCl ₃ , 25)
Boc-Phe-Leu-OBzl	10	89	81~83	-24.9(1.0, MeOH, 25)
Boc-Leu-Val-OMe	10	92	146~147	-45.3(1.0, MeOH, 25)
Boc-Leu-Phe-OMe	10	92	80	-29.5(1.0, MeOH, 25)
Boc-Gly-Gly-OBzl	10	94	79~81	-
Z-Phe-Gly-OBzl	10	92	130~131	-25.2(0.4, MeOH, 25)
Z-Phe-Leu-OMe	10	90	101~103	-25.5(3.1, MeOH, 25)

의 펩티드의 수율은 90~96%에 이를 정도로 매우 좋았으며(Table 4). 아미노산 에스테르의 크기에 관계없이 고른 분포를 보여주고 있다. 또한 spacer arm이 없는 레진의 경우와 마찬가지로 spacer arm의 길이가 긴 경우에도 반복 사용에 의한 레진의 반응성 변화가 없었으며[9], 반응의 진행 정도는 색 변화로 쉽게 알 수 있었다. 또한 기능기와 레진의 결합은 안정한 우레아 형태이므로 유리 아미노기에 장시간 노출되어도 안정하였다. 이같은 결과들은 기능기와 고분자 사슬 사이에 적당한 길이의 spacer arm 존재의 필요성을 나타내주고 있다[23]. 즉 피라졸 기능기가 고분자 사슬 깊숙히 존재하지 않고 길이가 큰 spacer arm에 의하여 어느 정도 bead 표면 가까이 존재한다면 친핵체의 공격이 용이해지기 때문에 고른 반응성과 높은 수율을 얻을 수 있다고 생각된다.

4. 결 론

1. Merrifield레진으로부터 합성한 aminomethyl레진은 ϵ -aminocaproic acid를 커플링 할 때 매 단계마다 유리 아미노기양이 25~30% 씩 감소했으며, Boc-group 제거 전에 아세틸화 처리를 해 주면 치환율 감소 현상을 약 1/3로 줄일 수 있었다.

2. Glycine-spacer arm 레진의 경우, ϵ -aminocaproic acid-spacer arm레진과 달리 치환율 감소 현상이 약 5% 내외로 적었다.

3. Polystyrene bead로 부터 직접 합성한 aminomethyl레진은 ACA를 커플링 할 때 매 단계마다 약 3~5%의 유리 아미노기만 감소하였다.

4. Polystyrene bead로부터 직접 aminomethyl기를 도입한 후 ϵ -ACA를 5개 커플링 시키고 피라졸기를 도입하여 spacer arm이 있는 피라졸레진을 합성하였다.

5. Spacer arm이 있는 피라졸레진은 아미노산 유도체의 종류에 관계없이 거의 비슷한 값으로 아실레진으로 변환되었으며, 각종 아미노산 에스테르와 반응시켜 펩티드를 합성할 때 10분 내에 89~96%로 반응이 종결되는 등 아실기 운반체로서의 우수성을 보여주었다.

감 사

본 연구는 1991년도 연암문화재단의 지원과 관련

한 연구로 이에 감사를 표하는 바입니다.

참고문헌

1. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2147 (1963).
2. W. F. Degrado and E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.*, **45**, 1295 (1980).
3. W. F. Degrado and E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.*, **47**, 3258 (1982).
4. S. H. Nakagawa and E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.*, **48**, 678 (1983).
5. M. Fridkin, Y. Stabinsky, V. Zakuth, and Z. Spierer, *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 203 (1977).
6. J. P. Tam, F. S. Tjoeng, and R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6117 (1980).
7. J. P. Tam, F. S. Tjoeng, and R. B. Merrifield, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 6493 (1980).
8. J. P. Tam, F. S. Tjoeng, and R. B. Merrifield, *Int. J. Pep. Protein Res.*, **16**, 412 (1980).
9. J. B. Kim and Y. S. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **12**, 376 (1991).
10. K. W. Lee and Y. S. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **10**, 331 (1989).
11. J. R. RaChem.le, *J. Org. Chem.*, **28**, 3898 (1963).
12. L. Zervas, M. Winitz, and J. P. Greenstein, *J. Org. Chem.*, **22**, 1515 (1955).
13. B. F. Gisin, *Anal. Chim. Acta*, **58** (1972).
14. J. M. Stewart and J. D. Young, "Solid Phase Peptide Sythesis", 2nd ed., Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, 1984, p. 105.
15. J. M. Stewart and J. D. Yonng, *ibid*, p. 113.
16. R. Kalir, N. Fridkin, and A. Patchornik, *Eur. J. BioChem.*, **42**, 151 (1974).
17. A. R. Mitchell and R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.*, **43**, 2845 (1978).
18. S. B. H. Kent, A. R. MitChem.ll, M. Engelhard, and R. B. Merrifield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2180 (1978).
19. M. A. Ondetti, N. J. Williams, E. F. Sabo, and J. Plusces, *Biochemistry*, **10**, 4033 (1971).
20. C. Birr, "Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis" In "Reactivity and Structure Con-

- cepts in Organic Chemistry" (K. Hafner *et al.* eds.), Vol. 8, Springer-Verlag, Berlin, 1978, p. 42
21. E. C. Taylor and K. S. Hartke, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6117 (1980).
22. M. Guarneri, E. Menegatti, P. Giori, R. X. Ferroni, R. Tomatis, and C. A. Benassi, *Gazz. Chim. Ital.*, **103**, 1105 (1973).
23. J. T. Sparrow, *J. Org. Chem.*, **41**, 1350(1976).