



УДК 547.964.4 : 542.95

## СИНТЕЗ ГЕКСАЭЙКОЗАПЕПТИДА (1—26) РИБОСОМАЛЬНОГО БЕЛКА L<sub>12</sub> *E. COLI*

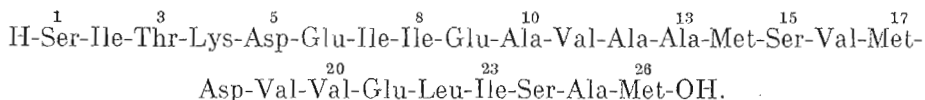
I. ПОЛУЧЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ 1—3, 1—8, 9—13 и 14—17

*Гудков А. Т., Шехватова Г. В.*

*Институт белка Академии наук СССР, Пушкино,  
Московская область*

С целью изучения функциональной роли N-концевой последовательности рибосомального белка L<sub>12</sub> предпринят синтез фрагментов 1—8, 9—13 и 14—17 N-концевой последовательности белка. Синтез осуществлен ступенчатым присоединением аминокислот классическими методами пептидной химии. Фрагмент 1—8 получен конденсацией пептидов с последовательностью 1—3 и 5—8 с использованием ДЦГК и добавлением N-оксисулцинимиды, а также азидным методом. Успешным оказался синтез фрагмента 1—8 с ДЦГК и полностью заблокированными боковыми группами аминокислот. Полученные фрагменты использовались в дальнейшем синтезе гексаэйкозапептида.

Первичная структура рибосомальных белков L<sub>7</sub> и L<sub>12</sub> расшифрована в 1972 г. [1]. Единственное различие этих белков состоит в том, что N-концевой серин белка L<sub>7</sub> имеет ацетильную группу. Показано, что белки L<sub>7</sub> и L<sub>12</sub> вовлечены в реакцию гидролиза гуанозинтрифосфата на различных стадиях рибосомального цикла — инициации, элонгации и терминации [2—4]. Недавно высказано предположение о важной функциональной роли N-концевой последовательности белков L<sub>7</sub> и L<sub>12</sub> [5]. Имея целью выяснить роль N-концевого фрагмента белка L<sub>12</sub>, мы предприняли синтез фрагментов гексаэйкозапептида 1—26:



План синтеза заключался в получении небольших фрагментов (3—6 аминокислот), с тем чтобы облегчить их выделение в кристаллическом виде и избежать трудностей, связанных с растворимостью больших пептидов. Из-за отсутствия глицина и пролина способ фрагментации был довольно произвольным. Синтез фрагмента 1—3 осуществлен по схемам 1 и 2. Синтез по схеме 1 не вызвал никаких затруднений. Синтез трипептида по схеме 2 осложняется трудоемкостью получения производных аминокислот и тем, что все пептиды — некристаллизующиеся вещества. Синтез фрагментов 4—8, 9—13 и 14—17 осуществлен по схемам 3, 4 и

Принятые сокращения: ДЦГК — дициклогексилкарбодимид; HONSu — N-оксисулцинимид; —OPsr — пентахлорфениловый эфир; ДМФА — диметилформамид.

Схема 1

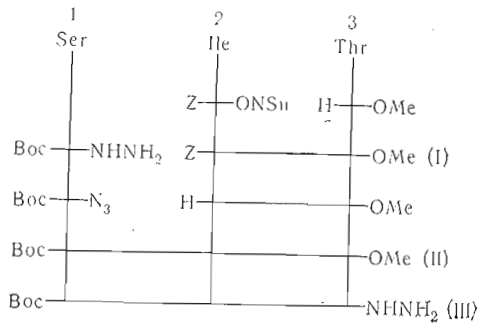


Схема 2

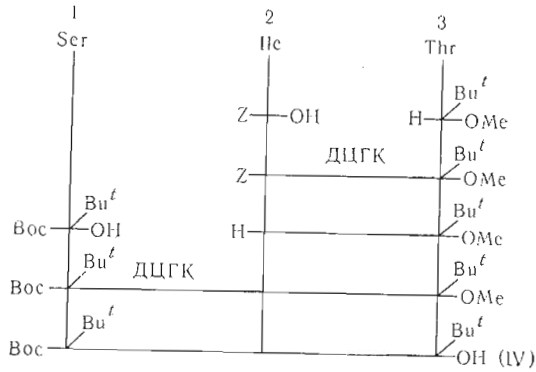
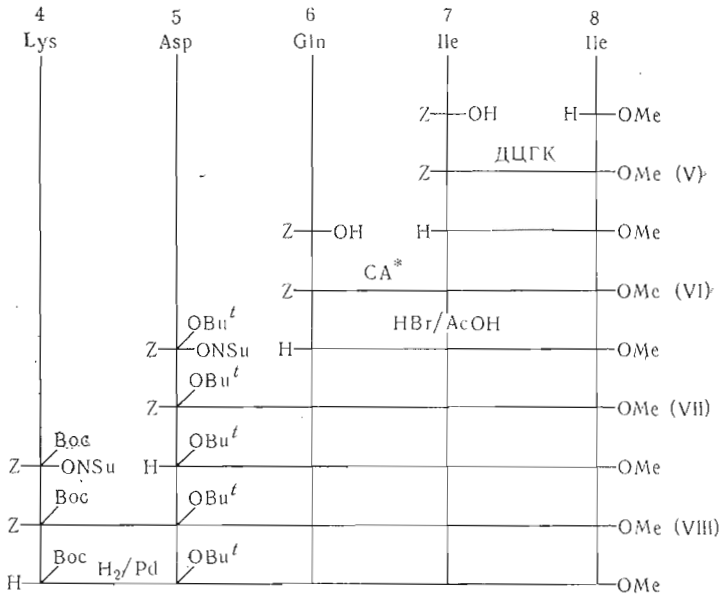
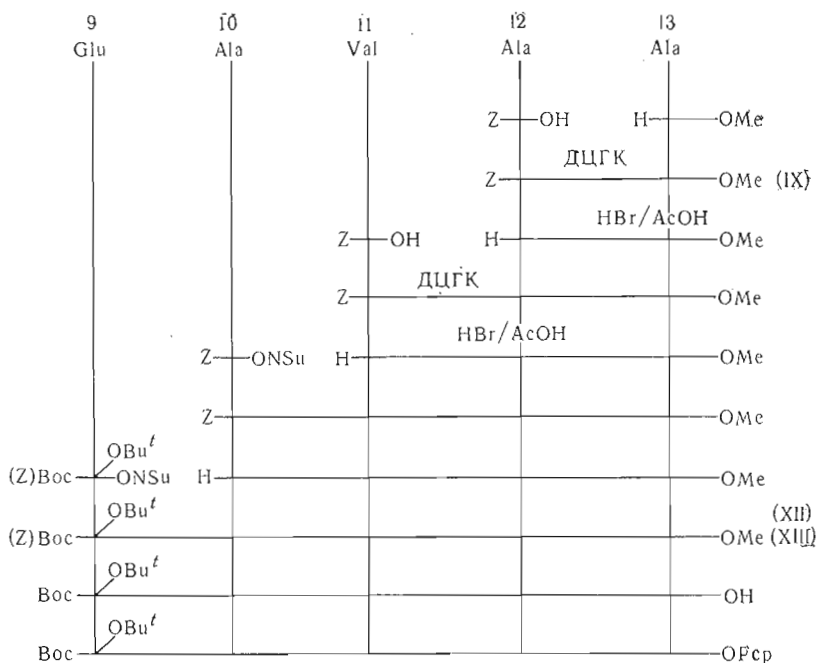


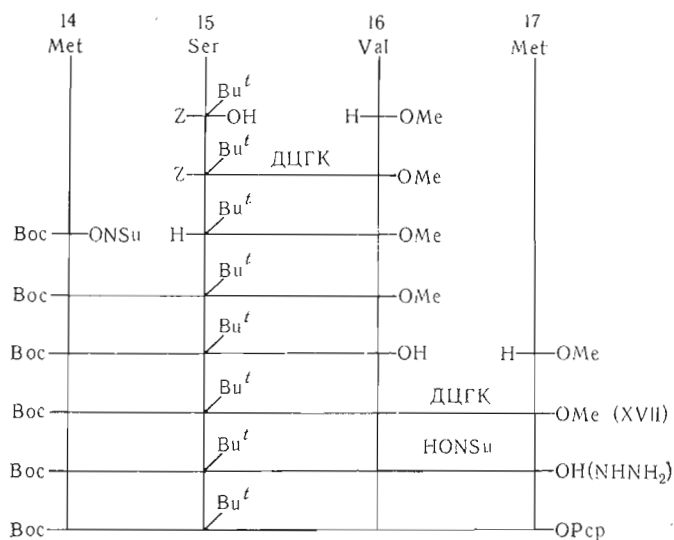
Схема 3



\* CA - метод смешанных ангидридов



С х е м а 5



5 соответственно. При получении пентапептида по схеме 4 некоторые трудности возникли из-за плохой растворимости тетра- и пентапептидов. Замена бензилоксикарбоксильной группы на *трет*-бутилоксикарбоксильную улучшила растворимость. Выбор схемы 5 обусловлен наличием метионина и серина и использованными защитными группами. Эфиры дипептида 15–16 и трипептида 14–16 — некристаллизующиеся соединения, что затрудняет их выделение и очистку. Октапептид 1–8 получен двумя путями. Первый путь синтеза был связан с азидной конденсацией трипептида 1–3 (схема 1) и метилового эфира пентапептида 4–8. Попытки перевести полученный метиловый эфир октапептида с незащищенными оксигруппами серина и треонина в гидразид не привели к успеху

даже при использовании 10 эквивалентов гидразин-гидрата в течение 3 сут в ДМФА, что, вероятно, связано с очень плохой растворимостью этого фрагмента. Неудовлетворительными были попытки получения октапептида азидной конденсацией трипептида и пентапептида со свободными N- и C-концевыми группами. Второй путь заключался в соединении трипептида 1—3 с блокированными оксигруппами серила и треонина и метилового эфира пептида 4—8 с помощью ДЦГК с добавкой N-оксисукцинимиды, что, как известно, уменьшает степень рацемизации при сочетании фрагментов [6]. Последующее омыление 1 н. NaOH в спирте протекало гладко, и реакцией с пентахлорфениловым эфиром трихлоруксусной кислоты был получен пентахлорфениловый эфир пептида 1—8, использованный в дальнейшем синтезе.

### Экспериментальная часть

Производные аминокислот получены по обычным методикам и их константы сравнены с приведенными в литературе [7, 8]. Температуры плавления определены на нагревательном столике «Воëtius» (ГДР) и приведены без исправления. Углы вращения определены на спектрополяриметре «Perkin-Elmer 141 M» (ФРГ), аминокислотный анализ проведен на анализаторе BC-201 (Швеция). Индивидуальность пептидов проверена на пластинках «Silufol» (ЧССР) в системах хлороформ — метанол, 9 : 1 (А), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Б) и *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 30 : 20 : 6 : 24 (В), а также электрофорезом на бумаге FN-3 (ГДР) на горизонтальном аппарате в 30%-ной уксусной кислоте и буфере пиридин — уксусная кислота 0,1 М, pH 5,7.

Электрофореграммы проявляли нишгидрином и хлортолидином, пластинки — хлортолидином, а в случае Вос-производных — также нингидрином, содержащим уксусную кислоту. Защитные группы удаляли HBr в уксусной кислоте, гидролизом над Pd-чернью (Z) и трифторуксусной кислотой (Вос-, OВu<sup>4</sup>). Синтез некоторых пептидов по схемам 1—5 подробно не описан; указаны количества исходных соединений и даны ссылки на аналогичные методики синтеза и выделения, приведенные в статье. Выходы, растворители для кристаллизации и некоторые константы указаны в таблице. Данные элементного анализа соответствуют вычисленным значениям С, Н, N для брутто-формулы, приведенных в таблице.

*Z-Ile-Thr-OMe (I)* (схема 1). К раствору 2,17 г (0,006 моль) N-оксисукцинимидного эфира бензилоксикарбонилизолейцина в ацетонитриле прибавляли раствор 1,33 г (0,0063 моль) хлоргидрата метилового эфира треонина и 1,1 мл триэтиламина в ацетонитриле. Реакционную смесь оставляли на 18 ч при комнатной температуре, затем разбавляли этилацетатом, промывали 10%-ным раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Образующийся после частичной отгонки этилацетата остаток кристаллизовали. Выход 1,94 г (85%), R<sub>f</sub> 0,54 (А).

*Woc-Ser-Ile-Thr-OMe (II)* (схема 1). 1,75 г гидразида Woc-Ser-NHNH<sub>2</sub> растворяли в минимальном количестве ДМФА, охлаждали до -20°, приливали 7 мл 2 н. HCl, содержащей 10% NaCl, затем добавляли 0,5 г нитрита натрия и перемешивали 5 мин при -20 ÷ -15°. После нейтрализации смеси 0,345 мл триэтиламина добавляли охлажденный раствор 1,5 г (0,0053 моль) гидрохлорида метилового эфира изолейцилтреонина в ДМФА с 0,735 мл триэтиламина и оставляли в холодильнике на сутки, затем разбавляли этилацетатом, промывали 10% раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После перекристаллизации из этилацетата выход продукта составил 1,3 г (57%), R<sub>f</sub> 0,8 (В).

*Woc-Ser(Bu<sup>4</sup>)-Ile-Thr(Bu<sup>4</sup>)-OH (IV)* (схема 2). 2 г (0,0077 моль) Woc-Ser(Bu<sup>4</sup>)-OH и 2,3 г (0,0077 моль) метилового эфира изолейцил-*O*-*трет*-

Пептид	Брутто-формула	Выход, % (растворитель для кристаллизации)	Т. пл.	$[\alpha]_D^{22}$ (с; растворитель)
(I) Z-Ile-Thr-OMe	$C_{19}H_{28}N_2O_6$	85 (этилацетат)	151—152	—17,1 (0,81; AcOH)
(II) Boc-Ser-Ile-Thr-OMe	$C_{19}H_{33}O_8N_3$	57 (этилацетат)	127—130	—49,2 (1,28; этанол)
(III) Boc-Ser-Ile-Thr-NHNH <sub>2</sub>	$C_{15}H_{23}N_5O_7$	69 (5%-ный этанол)	222—225	—36,0 (0,83; AcOH)
(IV) Boc-Ser-(Bu <sup>t</sup> )-Ile-Thr(Bu <sup>t</sup> )-OH	$C_{26}H_{49}N_5O_8 \cdot CH_3OH$	50 (аморф)	—	—18,5 (1,20; AcOH)
(V) Z-Ile-Ile-OMe	$C_{21}H_{32}N_2O_5$	72 (этилацетат/гексан)	128—129	—22,5 (1,22; этанол)
(VI) Z-Gln-Ile-Ile-OMe	$C_{26}H_{40}N_4O_7$	74 (DMFA)	263	—28,3 (1,38; AcOH)
(VII) Z-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Gln-Ile-Ile-OMe	$C_{34}H_{53}N_5O_{10}$	79 (этилацетат/гексан)	221—223	—28,5 (1,49; AcOH)
(VIII) Z-Lys(Boc)-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Gln-Ile-Ile-OMe	$C_{46}H_{72}N_7O_{13}$	74 (этанол/эфир)	198—206	—18,6 (0,80; AcOH)
(IX) Z-Ala-Ala-OMe	$C_{15}H_{20}N_2O_6$	88 (этилацетат/гексан)	103—104	—34,0 (1,0; AcOH)
(X) Z-Val-Ala-Ala-OMe	$C_{20}H_{29}N_3O_6$	89 (этилацетат)	195—200	—51,3 (1,04; AcOH)
(XI) Z-Ala-Val-Ala-Ala-OMe	$C_{23}H_{34}N_4O_7$	93 (этанол/эфир)	234—237	—56,7 (1,30; AcOH)
(XII) Z-Glu(OBu <sup>t</sup> )-Ala-Val-Ala-Ala-OMe	$C_{32}H_{49}N_5O_{10}$	74 (этанол/эфир)	247—248	—51,7 (1,50; AcOH)
(XIII) Boc-Glu(OBu <sup>t</sup> )-Ala-Val-Ala-Ala-OMe	$C_{29}H_{41}N_5O_{10}$	84 (этанол/эфир)	240—243	—61,7 (0,96; AcOH)
(XIV) Boc-Glu(OBu <sup>t</sup> )-Ala-Val-Ala-Ala-OH	$C_{28}H_{40}N_5O_{10}$	92 (этанол/эфир)	255—263	—55,5 (1,71; AcOH)
(XV) Boc-Glu(OBu <sup>t</sup> )-Ala-Val-Ala-Ala-OPcp	$C_{34}H_{48}N_5O_{10}Cl_6$	52 (этанол/эфир)	223—229	—18,5 (1,15; DMFA)
(XVI) Boc-Met-Ser(Bu <sup>t</sup> )-Val-OH	$C_{26}H_{41}N_3O_7S$	(этилацетат/гексан)	105—106	—6,1 (1,62; AcOH)
(XVII) Boc-Met-Ser(Bu <sup>t</sup> )-Val-Met-OMe	$C_{25}H_{39}N_4O_8S_2$	75 (этилацетат/гексан)	210—216	—36,7 (0,39; этанол)
(XVIII) Boc-Met-Ser(Bu <sup>t</sup> )-Val-Met-OH	$C_{27}H_{50}N_4O_8S_2$	95 (этилацетат/гексан)	90—92	—23,0 (0,47; этанол)
(XIX) Boc-Met-Ser(Bu <sup>t</sup> )-Val-Met-NHNH <sub>2</sub>	$C_{27}H_{52}N_6O_7S_2$	80 (этанол/эфир)	255—260	—32,9 (1,24; AcOH)
(XX) Boc-Met-Ser(Bu <sup>t</sup> )-Val-Met-OPcp	$C_{33}H_{48}N_4O_8S_2Cl_3$	95 (этилацетат/гексан)	168—173	—7,6 (1,31; DMFA)
(XXI) Boc-Ser(Bu <sup>t</sup> )-Ile-Thr(Bu <sup>t</sup> )-Lys(Boc)-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Gln-Ile-Ile-OMe	$C_{68}H_{114}N_{10}O_{18}$	78 (этанол)	225—227	—30,2 (1,82; AcOH)
(XXII) Boc-Ser(Bu <sup>t</sup> )-Ile-Thr(Bu <sup>t</sup> )-Lys(Boc)-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Gln-Ile-Ile-OH	$C_{68}H_{112}N_{10}O_{18}$	81 (этанол/эфир)	187—191	—16,1 (0,72; AcOH)
(XXIII) Boc-Ser(Bu <sup>t</sup> )-Ile-Thr(Bu <sup>t</sup> )-Lys(Boc)-Asp(OBu <sup>t</sup> )-Gln-Ile-Ile-OPcp	$C_{68}H_{111}N_{10}O_{18}Cl_5$	82 (этанол/эфир)	185—191	—20,4 (0,8; AcOH)

бутил-треонина растворяли в минимальном объеме хлористого метилена, охлаждали до  $-10 \div -15^\circ$ , добавляли раствор 2,42 г (0,0085 моль) дициклогексилкарбодимида в 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и оставляли на ночь в холодильнике. Выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали, оставшееся некристаллизующееся масло (4 г) растворяли в 25 мл метанола, добавляли 10 мл раствора 0,29 г (1 экв.) NaOH в воде и омыляли в течение 1 ч при комнатной температуре. Метанол испаряли на роторном испарителе, водный раствор экстрагировали эфиром, подкисляли 10% лимонной кислотой и экстрагировали этилацетатом. После отгонки растворителя получали аморфный порошок, 2 г (50%),  $R_f$  0,8 (A). Омылением в аналогичных условиях получены пептиды XVI, XVIII.

*Z-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Gln-Ile-Ile-OMe* (VII) (схема 3). 2,33 г (0,005 моль) гидробромида метилового эфира глутаминилизолейцилизолоейцина и 2,06 г (0,005 моль) *Z-Asp(OBu<sup>t</sup>)-ONSu* растворяли в минимальном количестве ДМФА или ацетонитрила, добавляли 0,685 мл триэтиламина и оставляли на сутки при комнатной температуре. После реакции пептид высаживали водой и сушили. После перекристаллизации из этилацетата с гексаном получили пептид (VII) с выходом 2,7 г (79%),  $R_f$  0,4 (A). Пептид XII и метиловый эфир пептида XVI (схемы 4 и 5) синтезировали и выделяли так же, как соединение VII.

*Z-Ile-Ile-OMe* (V) (схема 3). К охлажденному до  $-10^\circ$  раствору 5,3 г (0,02 моль) бензилоксикарбонилизолейцина и 2,8 мл триэтиламина в хлористом метилена прибавляли 3,7 г (0,02 моль) хлоргидрата метилового эфира изолейцина и раствор 4,32 г (0,021 моль) дициклогексилкарбодимида в том же растворителе. Реакционную смесь перемешивали при  $0^\circ$  в течение 1 ч, затем оставляли на ночь в холодильнике. Выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 10% раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Продукт после отгонки растворителя кристаллизовали из этилацетата с гексаном. Выход 5,6 г (72%),  $R_f$  0,74 (A).

Пептид (IX) получен по схеме 4 аналогично соединению (V).

*Z-Val-Ala-Ala-OMe* (X) (схема 4) синтезирован и выделен аналогично соединению (V), исходя из 6,3 г (0,025 моль) бензилоксикарбонилвалина, 6,37 г (0,025 моль) гидробромида метилового эфира аланилаланина.  $R_f$  0,6 (A).

*Z-Ala-Val-Ala-Ala-OMe* (XI) (схема 4) синтезирован и выделен аналогично соединению (VII), исходя из 3,53 г (0,011 моль) N-оксисукцинимидного эфира бензилоксикарбонилаланина и 3,4 г (0,010 моль) гидробромида метилового эфира валилаланилаланина.  $R_f$  0,5 (A).

*Z-Lys(Boc)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Gln-Ile-Ile-OMe* (VIII) (схема 3) получен и выделен аналогично соединению (VII), исходя из 1,6 г *Z-Lys(Boc)-ONSu* и 1,9 г  $\text{AcOH} \cdot \text{Asp(OBu<sup>t</sup>)-Gln-Ile-Ile-OMe}$ .  $R_f$  0,6 (A).

*Boc-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Ala-Val-Ala-Ala-OMe* (XIII) (схема 4) получен и выделен аналогично соединению (VII), исходя из 3,3 г  $\text{Boc-Glu(OBu<sup>t</sup>)-ONSu}$  и 3,2 г гидробромида тетрапептида *Ala-Val-Ala-Ala-OMe*.  $R_f$  0,35 (A).

*Boc-Met-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Val-Met-OMe* (XVII) (схема 5). 2,8 г (0,0057 моль) трипептида  $\text{Boc-Met-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Val-OH}$  и 1,15 г (0,0058 моль) хлоргидрата метилового эфира метионина растворили в минимальном объеме хлористого метилена, охладили до  $-10 \div -15^\circ$ , добавили 0,8 мл триэтиламина, 0,66 г N-оксисукцинимид в 5 мл ДМФА и 1,18 г карбодимида в 10 мл хлористого метилена. После выпадения дициклогексилмочевины смесь оставили на сутки при комнатной температуре. Пептид выделен аналогично соединению (I). Выход 2,7 г (75%),  $R_f$  0,4 (A).

*Z-Gln-Ile-Ile-OMe* (VI) (схема 3). 3,7 г (0,013 моль) бензилоксикарбонилглутаминила и 3,1 мл (0,013 моль) три-*n*-бутиламина растворяли в тетрагидрофуране, при перемешивании и охлаждении до  $-15^\circ$  прибавляли по каплям 1,3 мл (0,013 моль) этилового эфира хлоругольной кислоты.

Реакционную смесь выдерживали в течение 15 мин при  $-12 \div -15^\circ$ , а затем прибавляли охлажденный до  $-12^\circ$  раствор 4,4 г (0,013 моль) бромгидрата метилового эфира изолейцилизолоейцина и 1,87 мл триэтиламина в тетрагидрофуране. Сразу же после добавления аминокомпоненты выпадал осадок, который отфильтровывали и перекристаллизовывали из ДМФА. Выход 5,0 г (74%),  $R_f$  0,6 (А). Данные элементного анализа и отсутствие в ИК-спектре пептида полосы поглощения нитрильной группы ( $2250 \text{ см}^{-1}$ ) свидетельствуют о сохранности амидной группы глутамина.

*Октапептид (1—8) Boc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Ile-Thr(Bu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Gln-Ile-Ile-OMe (XXI)*. 0,001 моль трипептида Boc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Ile-Thr(Bu<sup>t</sup>)-OH(IV) и 0,82 г (0,001 моль) хлоргидрата метилового эфира 4—8, полученного гидрогенолизом пентапептида (VIII), растворяли в ДМФА, добавляли 0,14 мл (0,001 моль) триэтиламина при  $-10^\circ$ , 0,12 г (0,001 моль) N-оксисукцинимид и 0,21 г (0,001 моль) ДЦГК и оставляли на ночь в холодильнике, затем на 2 сут при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли диоксаном, мочевины отфильтровывали, пептид высаживали водой, сушили, перекристаллизовывали из спирта. Выход 1 г (78%),  $R_f$  0,7 (А).

*Омыление октапептида (XXI)*. 1 г (0,8 ммоль) метилового эфира октапептида (XXI) растворяли в спирте и омыляли 3 ч 1 н. раствором NaOH (0,78 мл). После осаждения пептида 1 н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$  пептид отфильтровывали, сушили и переосаждали из спирта эфиром. Получили 0,8 г (81%) соединения (XXII).  $R_f$  0,2 (А) и 0,8 (Б).

*Пентахлорфениловый эфир октапептида (XXIII)*. 0,7 г (0,54 ммоль) омыленного пептида (XXII) растворяли в ДМФА, добавляли 0,08 мл (0,54 ммоль) триэтиламина и 0,41 г (1 ммоль) пентахлорфенилового эфира трихлоруксусной кислоты [9]. Реакционную массу оставляли при перемешивании на 5 ч, затем выливали в воду, отфильтровывали, сушили и переосаждали из спирта эфиром. Получили 0,7 г (82%) пентахлорфенилового эфира (XXIII).  $R_f$  0,7 (А).

Аналогично были получены пентахлорфениловые эфиры пептидов (XV) и (XX).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Terhorst C., Moller W., Laursen R., Witmann-Liebold B. (1972) FEBS Lett., 28, 325—328.
2. Fakunding J. L., Traut R. R., Hershey J. W. (1973) J. Biol. Chem., 248, 8555—8559.
3. Kung H., Fox J. E., Spears C., Brot N., Weissbach H. (1973) J. Biol. Chem., 248, 5012—5015.
4. Brot N., Tate W. P., Caskey G. T., Weissbach H. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 89—92.
5. Vesentin L. P., Matheson A. T., Gaguchi M. (1974) FEBS Lett., 41, 310—314.
6. Wunsch E., Dress F. (1966) Chem. Ber., 99, 110.
7. Fletcher G. A., Jones J. H. (1972) Int. J. Peptide and Prot. Res., 4, 347—371.
8. Fletcher G. A., Jones J. H. (1975) Int. J. Peptide and Prot. Res., 7, 91—102.
9. Yajima H., Kiso J. (1974) Chem. Pharm. Bull., 22, 1061—1066.

Поступила в редакцию

7.VII.1975

После переработки

20.III.1976

#### SYNTHESIS OF HEXAEICOSAPEPTIDE (1-26) OF RIBOSOMAL PROTEIN

L<sub>12</sub> *E. COLI*. I. THE PREPARATION OF FRAGMENTS 1-3, 1-8, 9-13 AND 14-17

GUDKOV A. T., SHEKHVATOVA G. V.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences  
of the USSR, Pushchino*

To study the functional role of the N-terminal sequence of the ribosomal protein L<sub>12</sub>, the synthesis of 1-3, 9-13 and 14-17 fragments of N-terminal moiety was undertaken. Stepwise condensation of amino acids by classical methods was utilized for this purpose. The fragment 1-8 was obtained by coupling 1-3 and 5-8 peptides in the presence of DCC and N-hydroxysuccinimide or using the azide method. The synthesis of 1-8 fragment by DCC-method was effectively performed with the all side chains being completely protected. The fragments obtained were used for the synthesis of hexaeicosapeptide.