



УДК 547.964.4 : 542.95

СИНТЕЗ ГЕКСАЭЙКОЗАПЕПТИДА (1—26) РИБОСОМАЛЬНОГО
БЕЛКА L_{12} *E. COLI*

II *. ПОЛУЧЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ 18—23, 18—26, 14—26 и 1—26

*Гудков А. Т., Шехватова Г. В.**Институт белка Академии наук СССР, Пущино,
Московская область*

Описан синтез фрагментов 18—23 и 24—26 белка L_{12} , осуществленный классическими методами пептидной химии. С использованием пептидов, полученных ранее, синтезирован гексаэйкозапептид 1—26. Нонапептид 18—26, тридекапептид 14—26 и октадекапептид 9—26 получены как с помощью пентахлорфениловых эфиров, так и азидным методом. Существенного различия в значениях удельного вращения пептидов, полученных этими методами, не обнаружено. Деблокированный гексаэйкозапептид очищен двукратной хроматографией на сефадексе G-50.

В предыдущей статье [1] мы сообщили о синтезе фрагментов 1—3, 1—8, 9—13 и 14—17 рибосомального белка L_{12} *E. coli*. В данной статье описан синтез фрагментов 18—23, 24—26 и конденсация всех промежуточных пептидов с образованием гексаэйкозапептида 1—26 рибосомального белка L_{12} . Синтез фрагментов 18—23 и 24—26 осуществлен по схемам 1 и 2.

При синтезе гексапептида 18—23 по схеме 1 существенных затруднений не возникло. Гексапептид 18—23 был также синтезирован ступенчатым присоединением аминокислот с использованием N-оксисукцинимидных эфиров и карбобензоксигруппой в качестве N-защитной группы. Константы полученных пептидов (IIIa) — (VIIa) приведены в табл. 1. Гидролиз нонапептида 18—26 проходил с трудом в отличие от гидролиза трипептида, который протекал без осложнений, но требовалось периодическое добавление свежего катализатора. Выходы и константы полученных соединений приведены в табл. 1.

При получении фрагмента 1—26 были использованы метод пентахлорфениловых эфиров и азидный (схема 3). В первом случае выходы пептидов были несколько выше, а значения удельного вращения пептидов, полученных обоими методами, были практически одинаковыми. В качестве катализатора при использовании пентахлорфениловых эфиров добавлялся N-оксисукцинимид [2]. Октадекапептид 9—26 и гексаэйкозапептид 1—26 были очищены на сефадексах G-25 и G-50.

* Сообщение I см. [1]. Принятые сокращения см. [1].

Схема 1

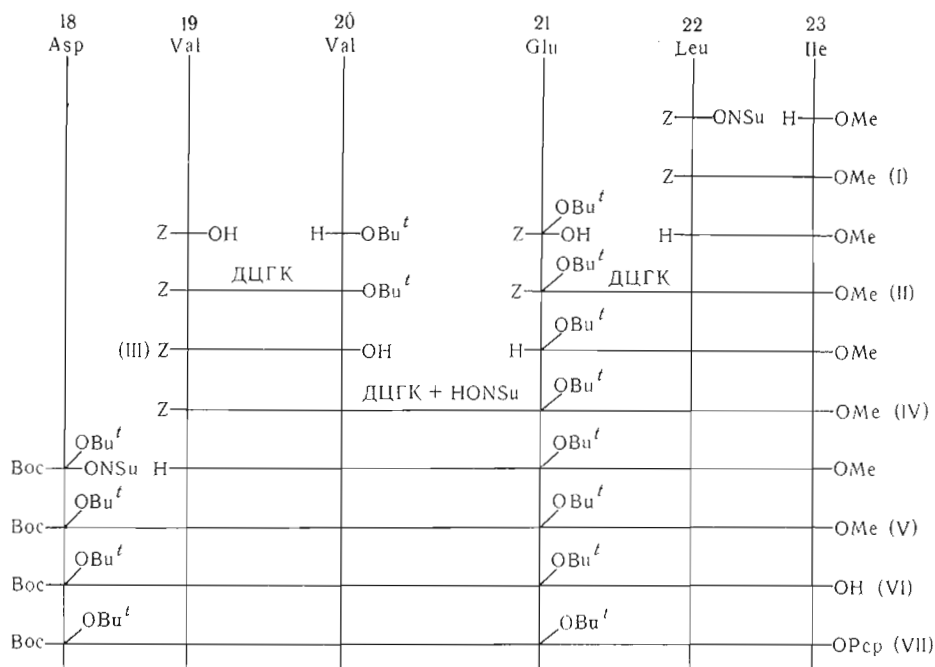
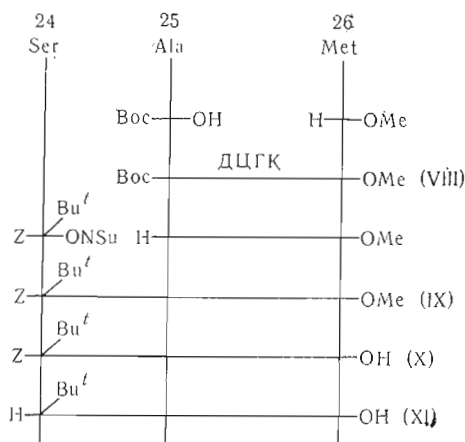


Схема 2

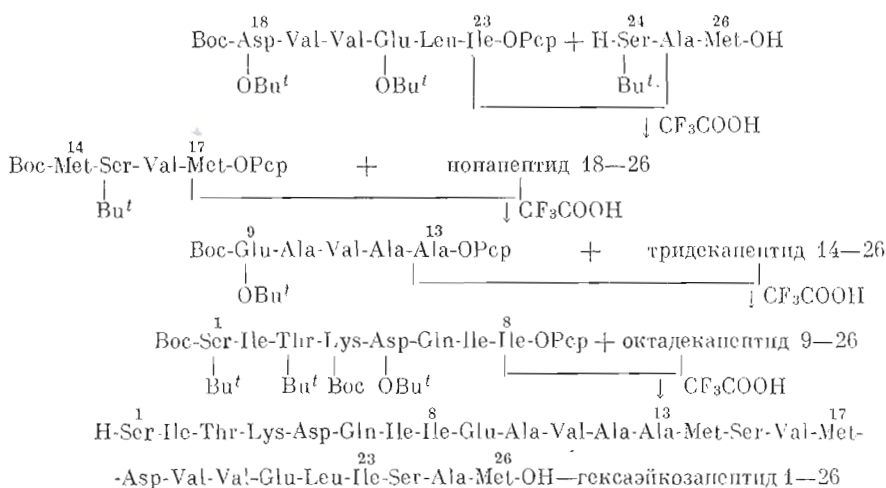


Экспериментальная часть

Материалы и методы, использованные в синтезе, описаны в [1]. Деблокирование метионинсодержащих пептидов трифторуксусной кислотой осуществлялось в атмосфере азота и с добавлением тиогликолевой кислоты. Пентахлорфениловые эфиры пептидов получены так же, как описано в [1]. Гидролиз пептидов проводился в 6 н. HCl при 110° в течение 72 ч с добавлением тиогликолевой кислоты (данные аминокислотного анализа фрагментов см. в табл. 2). Омыление проводили в метаноле с эквивалентом щелочи, конец реакции определяли по обесцвечиванию тимолфталеина или хроматографически — по исчезновению эфира пептида.

Диск-электрофорез проводили с помощью прибора фирмы «Reanal» (Венгрия), модель 69, в 15% полиакриламидном геле. Для геля использо-

С х е м а 3



вали трис-НСI-буфер (рН 8,9), для электродов — трис-глициновый буфер (рН 8,3), 5 мА на трубочку, 1,5 ч. Окрашивашие проводилось кумаси голу-бым.

Z-Leu-Ile-OMe (I) (схема 1). 7,03 г (0,02 моль) N-оксисукцинимидного эфира бензилоксикарбониллейцина и 3,6 г (0,02 моль) хлоргидрата метилового эфира изолейцина растворяли в минимальном объеме диоксана, добавляли 2,78 мл триэтиламина и оставляли при комнатной температуре на сутки. Реакционную смесь разбавляли водой, экстрагировали этилацетатом, промывали 10% лимонной кислотой, водой и сушили над сульфатом натрия. После упаривания растворителя и кристаллизации получили 6,7 г (85%) дипептида R_f 0,95 (А). Аналогично получен и выделен пептид IX. R_f 0,7 (А).

Z-Glu(OBu^t)-Leu-Ile-OMe (II) (схема 1). 3,5 г (0,01 моль) γ -трет-бутилового эфира бензилоксикарбонилглутаминовой кислоты и 3,0 г (0,01 моль) гидрохлорида метилового эфира лейцилизойлейцина растворяли в минимальном объеме хлористого метилена, охлаждали до $-10 \div -15^\circ$, добавляли 1,39 мл триэтиламина и 2,06 г карбодимид в 10 мл хлористого метилена. После выпадения мочевины реакционную массу оставляли на ночь в холодильнике. Дидциклогексимочевину отфильтровывали, растворитель отгоняли на ротационном испарителе, растворяли в этилацетате. После обычной промывки и кристаллизации получили 4 г (70%), R_f 0,8 (А). Аналогично получен и выделен пептид VIII.

Z-Val-Val-Glu(OBu^t)-Leu-Ile-OMe (IV) (схема 1). 1,97 г (0,0041 моль) гидрохлорида трипептида H-Glu(OBu^t)-Leu-Ile-OMe, 1,47 г (0,0041 моль) бензилоксикарбонилваливалина (III) растворяли в смеси диоксан — тетрагидрофуран (1 : 1), добавляли 0,58 мл триэтиламина, 0,57 г N-оксисукцинимид, охлаждали до -10° и затем прибавляли 0,86 г карбодимид, после выпадения мочевины смесь оставляли при комнатной температуре на сутки. Мочевину отфильтровывали, смесь разбавляли этилацетатом, промывали как обычно. При упаривании этилацетата наступает кристаллизация. Выход 2,5 г (73%), R_f 0,65 (А).

Boc-Asp(OBu^t)-Val-Val-Glu(OBu^t)-Leu-Ile-OMe (V) (схема 1). 1,1 г (0,0028 моль) Boc-Asp(OBu^t)-ONSu и 1,7 г (0,0024 моль) ацетата пентапептида H-Val-Val-Glu(OBu^t)-Leu-Ile-OMe растворяли в минимальном объеме ДМФА, прибавляли 0,38 мл триэтиламина и оставляли на сутки при комнатной температуре. Смесь разбавляли 5% уксусной кислотой, промывали водой, сушили в вакуумном шкафу и перекристаллизовывали. Выход 1,95 г (83%), R_f 0,70 (А). Аналогично синтезированы и выделены пептиды IIIa—Va (табл. 1).

Таблица 1

Цепид	Брутто-формула	Выход, % (растворитель для кристаллизации)	Т. пл.	$[\alpha]_D^{22}$ (с; растворитель)
(I) Z-Leu-Ile-OMe	$C_{21}H_{32}N_2O_5$	85 (этилацетат/гексан)	63—64	—25,4 (4,1; метанол)
(II) Z-Glu(OBu ^t)-Leu-Ile-OMe	$C_{20}H_{47}N_3O_8$	70 (этилацетат/гексан)	129—131	—36,6 (0,9; метанол)
(III) Z-Val-Val-OH *	$C_{18}H_{28}N_2O_5$	70 (этилацетат/гексан)	133—140	—19,6 (4,46; метанол)
(IV) Z-Val-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Ile-OMe	$C_{40}H_{88}N_5O_{10}$	73 (этилацетат)	240—247	—56,6 (0,35; этанол)
(V) Вос-Asp(OBu ^t)-Val-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Ile-OMe	$C_{43}H_{80}N_6O_{13}$	83 (этилацетат/гексан)	240—246	—45,0 (0,60; AcOH)
(IIIa) Z-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Ile-OMe	$C_{33}H_{56}N_4O_9$	89 (этилацетат/гексан)	177—182	—41,3 (4,08; этанол)
(IVa) Z-Val-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Ile-OMe	$C_{40}H_{65}N_5O_{10}$	77 (этилацетат/эфир)	241—247	—57,6 (0,39; этанол)
(Va) Z-Asp(OBu ^t)-Val-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Ile-OMe	$C_{48}H_{78}N_6O_{13}$	70 (этанол)	253—254	—43,6 (0,82; AcOH)
(VIa) Z-Asp(OBu ^t)-Val-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Ile-OH	$C_{47}H_{76}N_6O_{13} \cdot 4,5H_2O$	89 (этанол)	200—208	—52,7 (0,72; этанол)
(VIIa) Z-Asp(OBu ^t)-Val-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Ile-OPcp	$C_{53}H_{73}N_6O_{13}Cl_5$	80 (этанол)	222—230	—41,3 (0,24; AcOH)
(VI) Вос-Asp(OBu ^t)-Val-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Ile-OH	$C_{44}H_{78}N_6O_{13} \cdot 2H_2O$	79 (этанол)	228—234	—49,6 (0,6; этанол)
(VII) Вос-Asp(OBu ^t)-Val-Val-Glu(OBu ^t)-Leu-Ile-OPcp	$C_{50}H_{77}N_6O_{13}Cl_5$	90 (DMFA/эфир)	235—238	—22,0 (0,49; DMFA)
(VIII) Вос-Ala-Met-OMe	$C_{11}H_{26}N_2O_5S$	88 (этилацетат/гексан)	78—79,5	—32,6 (0,88; этанол)
(IX) Z-Ser(Bu ^t)-Ala-Met-OMe	$C_{24}H_{37}N_3O_7S$	68 (этилацетат)	161—162	—23,7 (0,53; этанол)
(X) Z-Ser(Bu ^t)-Ala-Met-OH	$C_{23}H_{35}N_3O_7S \cdot 4,5H_2O$	92 (этанол/эфир)	131—132	—17,39(4,15; метанол)

* Данные работы [4]: т. пл. 133—140°; работы [5]: 114—155,5°.

Результаты аминокислотного анализа фрагментов 18—26, 9—26, 1—26

Фрагмент		Asp	Thr	Ser	Glu	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Lys
18—26	Вычислено	1	—	1	1	1	2	1	1	1	—
	Найдено	1,1	—	0,9*	1	0,9	1,9	0,8	0,9	1,1	—
9—26	Вычислено	1	—	2	2	4	4	3	1	1	—
	Найдено	1	—	1,7*	2,3	4	4,2	2,6	1,1	1	—
1—26	Вычислено	2	1	3	3	4	4	3	4	1	1
	Найдено	2,3	0,8*	2,9*	3,2	4,0	4,1	2,7	3,6	1,3	0,9

* Данные для Thr и Ser получены при 24-часовом гидролизе.

H-Ser(Bu¹)-Ala-Met-OH(XI) (схема 2). 1 г (2,6 ммоль) соединения (X), растворенного в метаноле, гидрировали над Pd-чернью с периодическим добавлением свежих порций катализатора (через 20—30 мин) в течение 6 ч; катализатор отфильтровывали, остаток после упаривания пересаждали из метанола абс. эфиром. Получили 0,7 г (92%) свободного трипептида (XI), электрофоретически однородного, $[\alpha]_D^{22} -9,4$ (с 0,35; AcOH), т. пл. 186—193°.

Boc-Asp(OBu¹)-Val-Val-Glu(OBu¹)-Leu-Ile-Ser(Bu¹)-Ala-Met-OH (18—26) (схема 3). К раствору 1,2 г (3,3 ммоль) трипептида (24—26) в ДМФА с небольшим количеством воды добавляли 0,46 мл (3,3 ммоль) триэтиламина и 1,2 г (1,3 ммоль) пентахлорфенилового эфира гексапептида 18—23. Реакционную смесь оставляли на 3 сут при комнатной температуре и постоянному перемешиванию, затем добавляли 0,1 н. AcOH, выпавший осадок отфильтровывали, сушили и обрабатывали кипящим этилацетатом. Выход 1,33 г (80%). $[\alpha]_D^{20} -40,0$ (с 0,49; AcOH). Найдено, %: С 55,65; Н 8,29; N 10,14. C₅₉H₁₀₅N₉O₁₇S. Вычислено, %: С 56,93; Н 8,50; N 10,12. Результаты аминокислотного анализа приведены в табл. 2. Аналогично получен нонапептид с N-бензилоксикарбонильной защитной группой. Выход 82,5%. $[\alpha]_D^{20} -33,8$ (с 0,74; AcOH), R_f 0,88 (B).

Boc-Met-Ser(Bu¹)-Val-Met-Asp-Val-Val-Glu-Leu-Ile-Ser-Ala-Met-OH (14—26) (схема 3). а) 0,5 г (0,46 ммоль) заблокированного нонапептида 18—26 растворяли в ДМФА, добавляли 0,26 мл триэтиламина, 0,61 г (0,7 ммоль) пентахлорфенилового эфира тетрапептида 14—17 и 0,06 г (0,5 ммоль) N-оксисукцинимид. Пептид выделяли, как и фрагмент 18—26. Выход 0,5 г (68,5%). $[\alpha]_D^{22} -43,3$ (с 0,46; AcOH). Найдено, %: С 51,66; Н 7,33; N 10,60. C₆₉H₁₂₁N₁₃O₂₂S₃·H₂O. Вычислено, %: С 51,83; Н 7,69; N 11,38.

б) Пептид получали азидной конденсацией тетрапептида 14—17 и трифторацетата нонапептида 18—26 в модификации Рудингера [3], выделение аналогичное, выход 50%. $[\alpha]_D^{22} -42,4$ (с 0,85; AcOH), R_f 0,84 (B).

Boc-Glu(OBu¹)-Ala-Val-Ala-Ala-Met-Ser-Val-Met-Asp-Val-Val-Glu-Leu-Ile-Ser-Ala-Met-OH (9—26) (схема 3). Пептид получен аналогично фрагменту 14—26 из 0,4 г (0,26 ммоль) трифторацетата тридекапептида 14—26 и 0,45 г (0,52 ммоль) пентахлорфенилового эфира пентапептида 9—13 с выходом 0,3 г (57%). После снятия защит трифторуксусной кислотой октадекапептид очищали гель-хроматографией на сефадексе G-25, колонка 2,5 × 100 см, буфер — 0,05 M NH₃/CO₂, pH 7,5, скорость элюции 11 мл/ч, взят первый пик с объемом выхода 190 мл. Данные аминокислотного анализа приведены в табл. 2. $[\alpha]_D^{22} -70,8$ (с 0,36; 50% AcOH) для пептида, полученного с использованием пентахлорфенилового эфира пентапептида; для пептида, полученного азидным методом, $[\alpha]_D^{22} -72,6$ (с 0,38; 50% AcOH). Пептиды однородны по электрофорезу на бумаге и диск-электрофорезу.

Получение гексаэйкозапептида 1—26 (схема 3). Пептид был получен аналогично фрагменту 9—26 из 0,14 г (0,07 ммоль) трифторацетата октадекапептида 9—26 и 0,22 г (0,14 ммоль) пентахлорфенилового эфира октапептида 1—8. После снятия защитных групп пептид дважды очищали гель-хроматографией на сефадексе G-50, колонка $1,5 \times 100$ см, буфер триэтиламмонийкарбонатный 0,05 М, рН 7,8, скорость элюции 5 мл/ч. Взята фракция с объемом выхода 150 мл. Выход 0,13 г (50%), $[\alpha]_D^{22} = -60,5$ (*c* 0,43; 50% АсОН). Определенные после очистки пептида серин на N-конце и последовательность Ser-Ala-Met на C-конце доказывают гомогенность полученного препарата, которая подтверждалась также данными диск-электрофореза.

Приносим глубокую благодарность Ю. В. Митину за внимание к работе, И. А. Кашпарову за проведение аминокислотного анализа и Л. Ф. Марковой за определение N- и C-концевых аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гудков А. Т., Шехватова Г. В. (1976) Биоорганич. химия, 2, 1035—1041.
2. König W., Geiger R. (1973) Chem. Ber., 106, 3626—3635.
3. Honzl J., Rudinger J. (1961) Collect. Czech. Commun., 26, 2333.
4. Numan M. A., Herbst R. M. (1950) J. Org. Chem., 15, 108.
5. Klieger E., Gibian H. (1961) Ann. Chem., 649, 183.

Поступила в редакцию
7.VII.1975

После переработки
20.III.1976

SYNTHESIS OF HEXAEICOSAPEPTIDE (1-26) OF RIBOSOMAL PROTEIN L₁₂ *E. COLI*. II. THE PREPARATION OF FRAGMENTS 18-23, 18-26, 14-26 AND 1-26

GUDKOV A. T., SHEKHVATOVA G. V.

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

The fragments 18-23 and 24-26 of protein L₁₂ were obtained by classical peptide synthesis. With the use of previously prepared peptides, hexaeicosapeptide 1-26 was synthesized. Nonapeptide 18-26, tridecapeptide 14-26 and octadecapeptide 9-26 were obtained both with pentachlorophenyl esters and by the azide method. There was no appreciable difference in specific rotation of the peptides prepared by these methods. After the removal of the protective groupings, hexaeicosapeptide was purified by repeated chromatography on Sephadex G-50.