



УДК 577.112

## ПОЛНЫЙ ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ $\gamma$ -СУБЪЕДИНИЦЫ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ cGMP СЕТЧАТКИ ГЛАЗ БЫКА И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА

© 1997 г. Л. Н. Родионова, В. Е. Заграничный, И. Л. Родионов<sup>#</sup>, В. М. Липкин\*, В. Т. Иванов\*

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142292, Пущино Московской обл.;

\* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 04.04.97 г. Принята к печати 08.08.97 г.

Твердофазным методом синтезирован 87-членный полипептид с аминокислотной последовательностью  $\gamma$ -субъединицы фосфодиэстеразы cGMP (PDE $\gamma$ ) палочек сетчатки быка. Представлены результаты двух синтетических подходов. В обоих случаях применяли Вос/Vzl-стратегию и синтез вели в проточном реакторе с использованием свеллографического мониторинга. В первом варианте синтеза 5 остатков аргинина присоединяли в виде Вос-Arg(Z)<sub>2</sub>-ОН, пептид отщепляли от подложки раствором CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>SiMe<sub>3</sub> и тиаоанизола в TFA. При этом был получен гетерогенный, богатый орнитинном, нерастворимый в водно-щелочных условиях и полностью неактивный пептид. Во втором варианте синтеза с использованием Arg(Tos) и метода отщепления от подложки low-high HF получен полипептид, гомогенный, по данным ВЭЖХ и капиллярного электрофореза, имеющий корректную молекулярную массу, по данным масс-спектрометрии, и обладающий полной функциональной активностью природного белка. Обнаружено влияние солей цинка на интенсивность флуоресценции растворов PDE $\gamma$  и на ее растворимость, что свидетельствует о значительном сродстве этого белка к ионам Zn<sup>2+</sup> и, возможно, имеет отношение к его функционированию в клетках сетчатки. Впервые получены данные о динамике набухания пептидилполимера в различных растворителях при синтезе очень длинных последовательностей.

**Ключевые слова:**  $\gamma$ -субъединица фосфодиэстеразы cGMP; твердофазный синтез пептидов (ТФСП); цинковые пальцы; набухание пептидилполимера; свеллографический мониторинг.

Фосфодиэстераза cGMP (PDE) из палочек сетчатки играет важную роль в процессе передачи зрительного импульса [1, 2]. Холофосфодиэстераза является гетеротетрамером состава  $\alpha\beta\gamma_2$  и функционально неактивна, что обусловлено ярко выраженными ингибиторными свойствами наи-

меньшей по молекулярным размерам  $\gamma$ -субъединицы (PDE $\gamma$ , 10 кДа, рис. 1) по отношению к каталитическим  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицам [1, 3]. Это высокоспецифическое "внутреннее" ингибирование фосфодиэстеразы собственной  $\gamma$ -субъединицей носит обратимый, регулируемый характер. Фосфодиэстеразная активность проявляется в результате взаимодействия фермента с  $\alpha$ -субъединицей G-белка трансдуцина, которая в свою очередь активируется фотовозбужденным родопсином [2, 4]. В GTP-связанном состоянии  $\alpha$ -субъединица трансдуцина благодаря конформационной перестройке молекулы приобретает высокое сродство к PDE $\gamma$ ; это сродство утрачивается после гидролиза трансдуцином связанного GTP до GDP [4]. Высокое сродство PDE $\gamma$  сразу к двум регуляторным белкам и необычная динамичность функционирования делают этот небольшой белок привлекательным объектом для подробных физико-химических исследований. Такие исследования были затруднены в связи с низким содержанием природной PDE $\gamma$  в сетчатке глаза животного. Последние достижения в области пептидного синтеза создали предпосылки для получения PDE $\gamma$  в достаточных для ис-

Сокращения: 2-Bz-Z- – 2-бромбензилоксикарбонил-; 2-Cl-Z- – 2-хлорбензилоксикарбонил-; Abu- – L- $\alpha$ -аминобутирил-; AcIm – N-ацетилимидазол; Acst- – ацетамидометил-; Bom- – бензоксиметил-; Bz-MPA- – 4-бромметилфенилацетил-; cHx- – циклогексил-; DCNA – дициклогексилламин; DCU – дициклогексилмочевина; DCM – хлористый метилен; DIC – диизопротилкарбодиймид; DIEA – диизопротилэтиламин; DMA – диметилацетамид; DMAP – диметиламинопиридин; Dnp- – 2,4-динитрофенил-; For- – формил-; FPLC – жидкостная хроматография умеренного давления; Gu · HCl – гуанидингидрохлорид; HOBt – 1-гидроксисбензотриазол; Met(O) – сульфоксиметионин; Mts- – 2,4,6-триметилбензилсульфонил-; OMPA- – 4-оксиметилфенилацетил-; Pac- – фенацил-; PDE и PDE $\gamma$  – фосфодиэстераза cGMP и ее  $\gamma$ -субъединица; Pfr- – пентафторфенил-; PS – сополимер стирола с 1% дивинилбензола (полистирол); TEA – триэтиламин; TFE – 2,2,2-трифторэтанол; TfP- – трифторметилсульфонил-; Xap- – ксантил-.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 925-23-42, (27) 73-54-42; факс: (095) 310-70-07, (27) 79-05-27; e-mail: rodionov@fibkh.serpukhov.su).

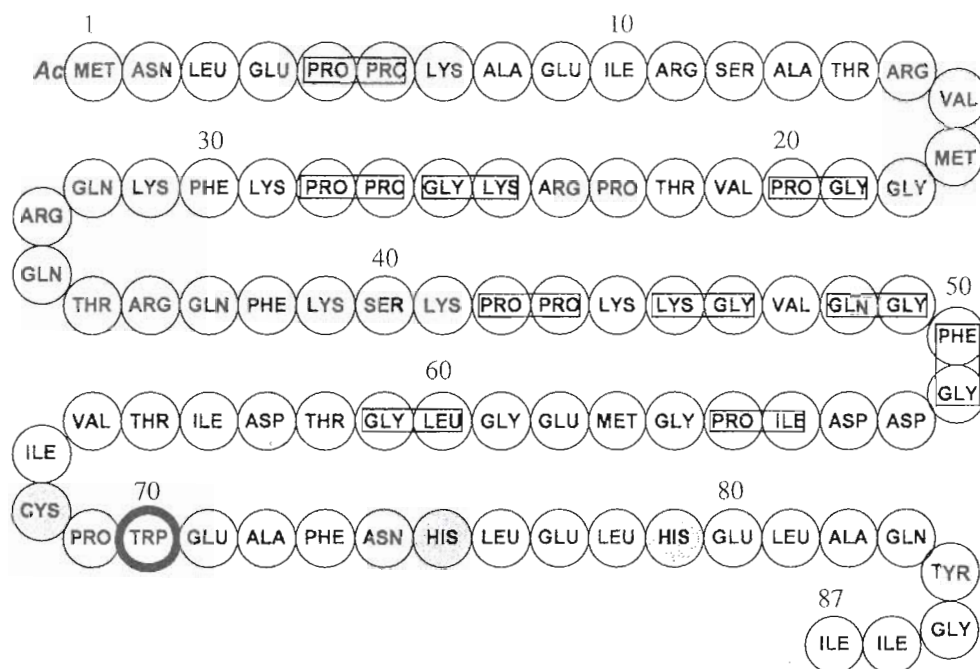


Рис. 1. Аминокислотная последовательность PDE $\gamma$  сетчатки глаз быка [1]. Затемнены аминокислотные остатки, возможно, принимающие участие в формировании "цинкового пальца". Выделен аминокислотный остаток Trp<sup>70</sup>, интенсивность флуоресценции которого зависит от концентрации катионов Zn<sup>2+</sup>. Прямоугольниками объединены аминокислотные остатки, присоединенные в ходе синтеза как дипептиды.

следования количествах. В данной статье описан синтез PDE $\gamma$  сетчатки глаз быка, ее очистка и некоторые физико-химические свойства полученного белкового препарата.

## 1. ПОЛНЫЙ ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ PDE $\gamma$ . ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДХОДА

Синтез PDE $\gamma$ , состоящей из 87 аминокислотных остатков, – непростая задача, поскольку в ее последовательности имеются остатки всех кодируемых аминокислот, в том числе три остатка Met и по одному остатку Cys и Trp, которые создают ряд методических проблем. Синтез был осуществлен твердофазным методом с протоколом, разработанным для светлогографического мониторинга [5] с использованием Boc/Bzl-стратегии. В качестве полимерной подложки был использован аминотетраметилтирированный полистирол (PS), к которому был присоединен Boc-Abu-остаток – внутренний стандарт для контроля за ходом синтеза с помощью аминокислотного анализа [6]. C-Концевой остаток Ile прикрепляли к полимерной подложке посредством образования сложноэфирной связи с гидроксиметилфенилацетиловой якорной группой [7, 8]. Эта конструкция значительно стабильнее первоначально предложенной Меррифилдом [9]. Ее использование сводит к минимуму систематическую потерю синтезируемого продукта на каждой ста-

дии синтеза и позволяет существенно повысить выход длинных полипептидов.

Для предотвращения окисления остатков Cys(Acm) и Met(O) следами перекисей, неизбежно присутствующих в THF, этот растворитель, рекомендуемый для промывок в работе [5], был заменен на хлористый метилен (DCM, табл. 1). Для предотвращения окислительной модификации и алкилирования лабильных боковых групп остатков Tyr, Trp, Met и Cys в нарастаемом полипептиде на протяжении всего синтеза использовали N $\alpha$ -деблокирующую смесь, содержащую 0.1% индола [10] в качестве акцептора катионов и реакционноспособных примесей. Эффективность промывок достигалась последовательной обработкой растворителями или их смесями, сжимающими полимер (BuOH/DMF в соотношении 3 : 1), и растворителями, в которых полимер хорошо набухает (DMF, DMA, DMSO/DMF в соотношении 1 : 4) [11]. Окончание промывок определяли визуально по выходу на плато регистрируемого самописцем сигнала светлотрафа. Этот сигнал является линейной функцией изменения объема полимера в реакторе и отражает степень сольватации пептидполимера в процессе синтеза (рис. 2). О полноте прохождения реакций конденсации судили по результатам качественного нитридного теста [12].

Большое число остатков Gly и Pro в структуре PDE $\gamma$  позволило уменьшить число стадий и увели-



Рис. 2. Светлограммы 2-й ( $\text{Gly}^{85}$ , нижняя кривая) и 69-й ( $\text{Glu}^9$ , верхняя кривая) стадий второго варианта твердофазного синтеза PDE $\gamma$ . Стрелками обозначены начала шагов синтеза в соответствии с протоколом (табл. 1). Косыми черточками на кривых обозначены разрывы, введенные для совмещения кривых по началам шагов в силу неодинаковой продолжительности одних и тех же шагов на разных стадиях (см. примечание 1 к табл. 1).

Таблица 1. Протокол твердофазного синтеза PDE $\gamma$

Шаг	Операция	Реагенты	Объем <sup>1</sup> , мл	Время <sup>1</sup> , мин
1	Промывка	DMF	10	5
2	Сжимающая промывка	Bu <sup>t</sup> OH/DMF (3 : 1)	10	5
3	Промывка	DCM	10	5
4 <sup>2</sup>	N <sup>α</sup> -Деблокирование	50% TFA и 0.1% индол в DCM	15	30
5	Промывка	DCM	20	10
6	Сжимающая промывка	Bu <sup>t</sup> OH/DMF (3 : 1)	20	10
7	Нейтрализация	5% DIEA в DCM	10	5
8	Повторная нейтрализация и промывки	Шаги 2, 7, 2, 1		
9 <sup>3</sup>	1-я конденсация	0.5 М раствор активированного Вос-производного аминокислоты или дипептида в DMF		
10	Промывки и нейтрализация	Шаги 2, 7, 2		
11	Промывка	DMF	30	15
12	»	DMA, если применение иного растворителя не оговорено особо <sup>4</sup>	20	10
13 <sup>3</sup>	2-я конденсация	0.5 М раствор активированного Вос-производного аминокислоты или дипептида в DMA, если применение иного растворителя не оговорено особо <sup>4</sup>		
14 <sup>5</sup>	Промывки и нейтрализация	Шаги 2, 7, 2, 11		

<sup>1</sup> Указаны усредненные значения времени и объема. Завершение каждого шага (кроме 4, 9 и 13) определяли в каждом случае отдельно по выходу на плато сигнала светллографа. Подачу реагентов в реактор вели со скоростью 2 мл/мин, если не оговорено иное (см. примечание 2 к шагу 4).

<sup>2</sup> N<sup>α</sup>-Деблокирующую смесь прокачивали через реактор со скоростью 2 мл/мин до выхода на плато сигнала светллографа (обычно на это требовалось 0.5–5 мин). Затем продолжали подачу смеси в реактор со скоростью 0.5 мл/мин еще 30 мин (при N<sup>α</sup>-деблокировании Вос-His(Вом)-фрагментов на стадиях 9 и 13 (см. табл. 3) – 45 мин).

<sup>3</sup> Конденсации осуществляли в режиме рециркуляции: вход и выход реактора подсоединяли к сосуду с 0.5 М раствором активированного Вос-производного. Продолжительности конденсаций, составы и объемы растворов приведены в табл. 3.

<sup>4</sup> См. примечания 1 (В и Г), 4 и 11 к табл. 3.

<sup>5</sup> По окончании шага 14 полноту конденсации оценивали с помощью качественного нингидринового теста Кайзера [12], отобрав аналитическую пробу полимера из реактора и тщательно промыв ее DCM. В случае неудовлетворительного результата проводили 3-ю конденсацию (см. табл. 3), выполняя шаги 12–14. При необходимости проводили 4-ю и 5-ю (на стадии 61 при присоединении Met<sup>17</sup>) конденсации.

чить эффективность синтеза благодаря использованию ряда предварительно синтезированных Вос-дипептидов с С-концевыми остатками Gly и Pro (см. рис. 1), которые в 6–15 раз более реакционноспособны, чем Вос-Gly-OH и Вос-Pro-OH [13]. Первую конденсацию на каждой стадии проводили в DMF, как правило, методом симметричных ангидридов для всех аминокислот, кроме Asp, Gln, Arg(Tos) и некоторых дипептидов, которые присоединяли методом НОВт-эфиров из-за обсуждаемых далее осложнений, возникающих при использовании DMAP – катализатора ацилирования.

Если не удавалось добиться полноты присоединения Вос-производного в результате 3-й конденсации, то 4-ю проводили в присутствии DMAP (0.1 экв. по отношению к Вос-производному). DMAP не применяли при присоединении аспарагина и глутамина (из-за их возможной дегидратации с образованием нитрилов) и Arg(Tos) (из-за опасности превращения его в  $\delta$ -лактамы). DMAP вводили в реакцию через 15–40 мин после начала конденсации для сведения к минимуму последствие возможной рацемизации С $^{\alpha}$ -атома присоединяемого остатка [14].

При ацилировании N-концевых остатков Gln и Glu растущей цепи для предотвращения обрыва цепей с образованием пироглутаминовой кислоты [15] были использованы симметричные ангидриды как наиболее реакционноспособные активированные производные. Известные осложнения, возникающие при работе с N $^{\alpha}$ -Tos- и N $^{\alpha}$ -Dnp-защищенным гистидином [9], склонили нас в пользу применения Bom-защиты N $^{\alpha}$ -функции гистидина [16]. При этом время реакции на стадии N $^{\alpha}$ -деблокирования было увеличено (см. примечание 2 к табл. 1) из-за низкой реакционной способности Вос-His(Bom)-фрагмента в реакции N $^{\alpha}$ -деблокирования [17, 18]. Кроме того, для предотвращения модификаций боковых цепей нами был использован набор защищенных аминокислот, обладающих повышенной устойчивостью в 50% TFA: Met(O), Lys(2-Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(2-Br-Z), Trp(For), Cys(Acm), Asp(OcHx), Glu(OcHx).  $\omega$ -сHx-эфиры аспарагиновой и глутаминовой кислот в значительной степени менее склонны к образованию аспартамидов и глутаримидов [19], катализируемому как сильными основаниями (DIEA), так и кислотами (HF на последней стадии).

Увеличение соотношения масс пептид/полимер критически сказывается на внешнем виде (качестве) светлограим. Полимер, обладая в начале синтеза замечательной способностью изменять объем при смене растворителей, практически утрачивает ее к концу синтеза (рис. 2), когда его масса увеличивается за счет пептида почти в 8 раз. Это связано с постепенным увеличением вклада полипептидного компонента в общий сольватационный баланс пептидполимера. Указанная зако-

номерность, однако, не относится к раствору TFA в DCM, в котором объем пептидполимера неуклонно возрастает благодаря превосходным сольватирующим свойствам этой смеси по отношению как к полистиролу, так и к полипептиду (рис. 2, шаг 4). Увеличение объема пептидполимера в TFA свидетельствует о разрушении водородных связей, обуславливающих агрегацию растущих пептидных цепей.

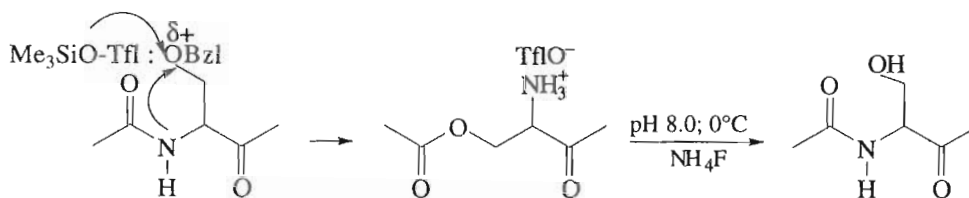
По завершении синтеза 87-членной аминокислотной цепи N-концевую группу пептидполимера деблокировали и после нейтрализации TFA количественно N-ацетилировали с помощью N-ацетилимидазола (природная PDE $\gamma$  тоже несет эту модификацию N-концевого остатка Met [1]).

## 2. ПЕРВЫЙ ВАРИАНТ СИНТЕЗА PDE $\gamma$ . ОСОБЕННОСТИ ПОДХОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ Me $_3$ SiO-TfI и PhSMe

Главной особенностью химической стратегии, реализованной в первом варианте твердофазного синтеза PDE $\gamma$ , была ориентация на использование раствора Me $_3$ SiO-TfI и PhSMe в TFA [20] для глобального деблокирования боковых защитных групп и отщепления от полимера. Наш опыт при работе с этим новым и удобным реагентом показал, что наиболее серьезными осложнениями являются неполное удаление используемых обычно Tos- и Mts-защитных групп остатков Arg и необратимое сульфонирование боковых функций остатков Tyr и Trp. Как нам представлялось, использование уретановых производных типа Вос-Arg(Z) $_2$ -OH должно было решить эти проблемы. Достоинствами этих малоизученных и труднодоступных производных являются их высокая растворимость в DCM и возможность получения их симметричных ангидридов (благодаря неспособности образовывать  $\delta$ -лактамы [21–25]).

Все пять остатков Arg присоединяли в первом варианте синтеза PDE $\gamma$  в виде (Вос-Arg(Z) $_2$ -O) $_2$ O. Однако, предотвратив таким образом на стадии конечного отщепления пептида с помощью Me $_3$ SiO-TfI/PhSMe осложнения, связанные с использованием Вос-Arg(Tos)-OH и Вос-Arg(Mts)-OH, мы столкнулись с другими проблемами. Гуанидиновая группа, несущая даже две Z-защиты, не утрачивает способности к дальнейшему ацилированию. Все пептиды, в синтезе которых участвовали активированные производные Вос-Arg(Z) $_2$ -OH, по данным аминокислотного анализа пептидполимеров, характеризовались низким содержанием аргинина и высоким – орнитина. Количество остатков Orn последовательно росло после каждой стадии конденсации активированного производного аминокислоты с Arg(Z) $_2$ -содержащим пептидполимером. По данным аминокислотных анализов образцов пептидполимеров, отобранных

в процессе синтеза PDE $\gamma$ , рассчитано, что удлинение аминокислотной цепи на один аминокислотный остаток приводило к увеличению количества Orn в среднем на 4% по отношению к присутствующему в пептидилполимере аргинину. Так, к концу синтеза PDE $\gamma$  из 5 необходимых остатков Arg было обнаружено только 2.3. После отщепления пептида от подложки соотношение Arg / Orn осталось неизменным.



Присутствие  $\text{NH}_4\text{F}$  на стадии щелочной обработки приводит к десилилированию конечного пептида ( $\text{Me}_3\text{SiO-TfI}$  потенциально очень активный силилирующий агент). Осуществлению этой необходимой стадии воспрепятствовало, однако, выпадение полипептида в осадок в щелочной среде даже в присутствии таких денатурирующих агентов, как мочевина и  $\text{Gu} \cdot \text{HCl}$ . По этой же причине было затруднено деформилирование остатка Trp.

Аналитическая ВЭЖХ показала высокую гетерогенность конечного полипептида, а ингибиторная активность, характерная для природной  $\gamma$ -субъединицы фосфодиэстеразы [1, 3], практически отсутствовала. Отсутствие активности в синтетическом продукте связано, вероятно, с модификациями остатков Arg (образованием орнитина и ветвлением пептидной цепи по  $\text{N}^\delta$ -функции). Такое объяснение согласуется с полученными методом направленного мутагенеза [3, 31] данными о критической роли остатка Arg<sup>24</sup> в проявлении ингибиторных свойств PDE $\gamma$ . Ввиду отсутствия биологической активности дальнейшие попытки характеристики синтетического продукта не предпринимались, и синтез был повторен с учетом всех нюансов и сложностей, выявленных в процессе первой попытки.

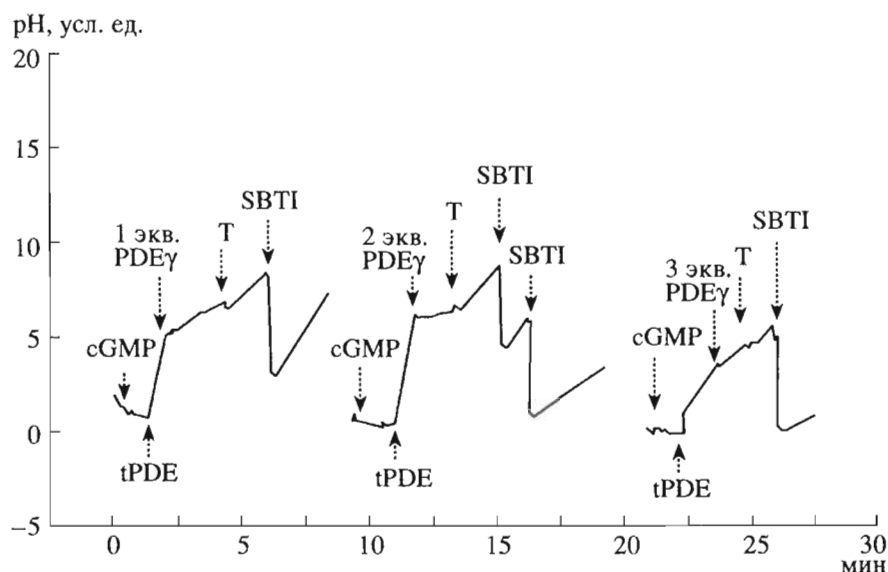
### 3. ОПТИМИЗИРОВАННЫЙ ВТОРОЙ ВАРИАНТ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА PDE $\gamma$ . ПРИМЕНЕНИЕ HF-"LOW-HIGH"-СТРАТЕГИИ

Существенные отличия второго варианта синтеза PDE $\gamma$  от первой попытки заключались в том, что присоединение остатков Boc-Arg(Tos) проводили в виде активированных HOBT-эфиров, а синтезированный пептид отщепляли от подложки методом HF-"low-high" [32, 33]. Проведение первой стадии процесса (HF-"low") в смеси HF/ $\text{Me}_2\text{S}$

Дополнительные осложнения при использовании  $\text{Me}_3\text{SiO-TfI/MeSPh}$  были связаны с нерастворимостью PDE $\gamma$  в щелочных условиях. При применении  $\text{Me}_3\text{SiO-TfI}$  и  $\text{MeSPh}$  [26–29] происходит частичная обратимая  $\text{N} \rightarrow \text{O}$ -изомеризация остатков Ser и Thr [30], и для регенерации пептидных связей этих остатков необходимо выдержать раствор пептида в щелочной среде:

позволяет свести к минимуму [32, 34, 35] многие известные побочные реакции, описанные для первоначально предложенного варианта метода [33], а также, по данным [10, 33], удалить стандартные защиты с боковых групп остатков Met и Trp. Вторая стадия (HF-"high") проводится после упаривания  $\text{Me}_2\text{S}$  в вакууме и обеспечивает практически полное удаление наиболее кислотоустойчивых защитных групп (сHx- и Tos-), а также эффективное расщепление сложноэфирной связи пептида с оксиметилфенилацетильной якорной группой. Синтез меченой [ $\text{Ac-}^{14}\text{C}$ ]PDE $\gamma$  показал, что в условиях HF-"low-high" отщепление полипептида от подложки проходит более чем на 99%. В нашем случае в качестве дополнительной меры предосторожности, направленной на снижение вероятности модификации боковых групп остатков Met, Cys, Trp и Tyr [9], обе стадии процесса проводили в присутствии триптофана и цистеина (по 10 экв. каждого) в дополнение к стандартным катионным ловушкам. Введение в реакционную смесь цистеина полезно в связи с его свойством связывать образующийся при расщеплении Boc-фрагмента формальдегид, способствующий образованию тиопроляна [36].

Показано [37], что метод HF-"low-high", в отличие от ранее опубликованных данных [14, 33], не приводит к полному удалению формильных защит с остатков Trp. Это согласуется и с нашими результатами. Дополнительное деформилирование остатков Trp мы осуществляли обработкой отщепленного от подложки полипептида 2-метиламиноэтанолом в 6 M  $\text{Gu} \cdot \text{HCl}$  по модифицированной методике [38]. Применение диацетата ртути в 50% уксусной кислоте для удаления Asp-защит с остатков Cys [39], по последним данным [40], приводит к переносу Asp-групп на свободные боковые функции остатков Thr, Ser, Asn и Gln, что заставило нас модифицировать методику [38]. Помимо глицерина, рекомендованного в работе [40]



**Рис. 3.** Тест на проявление ингибиторной активности неочищенной PDE $\gamma$ , полученной в результате второго варианта твердофазного синтеза. Метод [41] основан на регистрации pH раствора трипсиноактивированной PDE (tPDE) и ее субстрата (сGMP). По скорости снижения pH за счет гидролиза сGMP до GMP определяют активность PDE. Добавление ингибиторной PDE $\gamma$  снижает активность tPDE (и соответственно скорость гидролиза сGMP). Добавление трипсина (Т) повышает активность tPDE за счет протеолиза ранее добавленной PDE $\gamma$ . Введение соевого ингибитора трипсина (SBTI) останавливает протеолиз PDE $\gamma$ .

для предохранения гидроксильных групп остатков Thr и Ser, мы использовали формамид для конкурентного подавления возможной модификации амидных групп остатков Gln и Asn (см. “Экспериментальную часть”).

#### 4. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СИНТЕЗА

Обычно отщепленные от полимерной подложки синтетические белки полностью неактивны. Лишь в редких случаях они спонтанно принимают нативную конформацию, и PDE $\gamma$  оказалась одним из таких счастливых исключений. После удаления полимера и грубой очистки (ультрафильтрация или диализ против 0.1 М AcOH, а затем против воды) продукт уже обладал 50% активности природного белка (рис. 3).

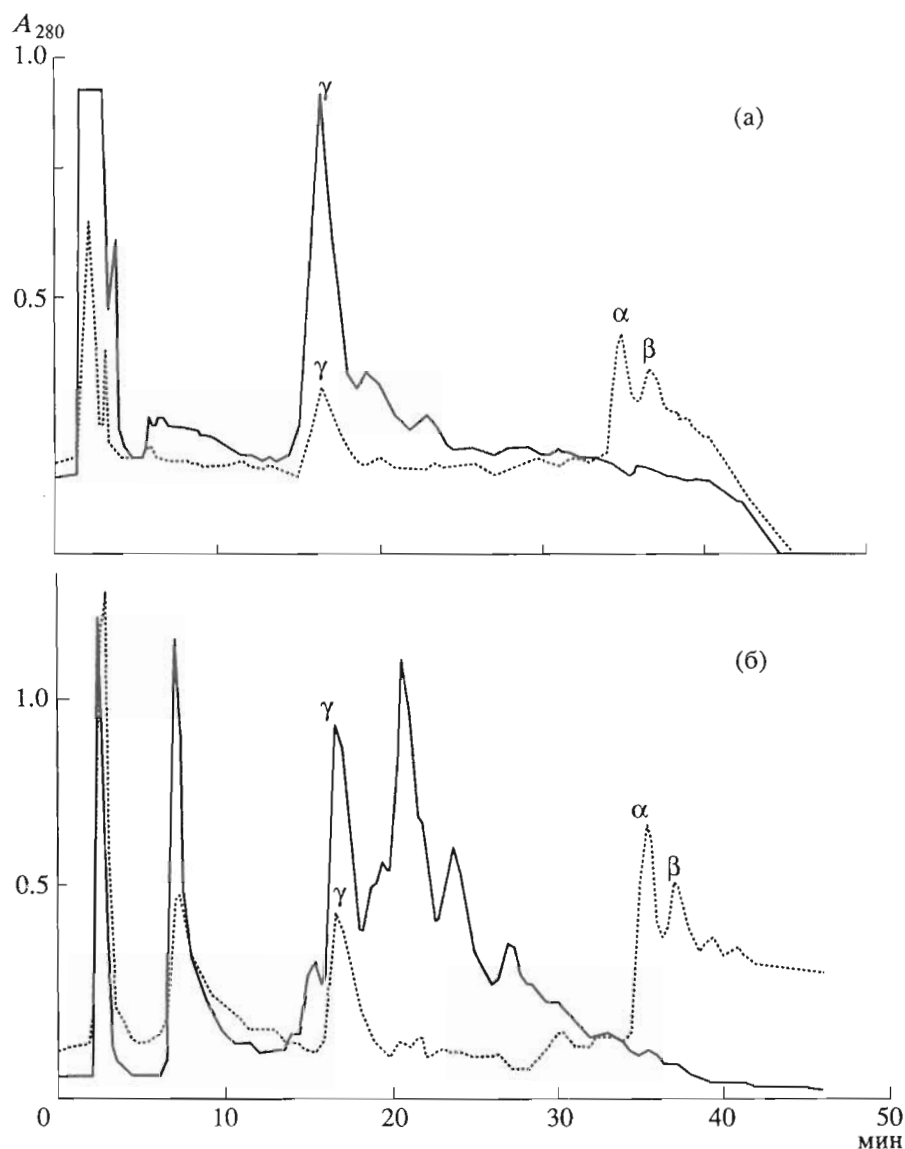
Для оценки эффективности синтеза и, следовательно, количества пептида с заданной последовательностью обессоленный образец секвенировали. Полноту реакций конденсации можно оценить, рассчитав степень делетирования пептидов или остатков на каждой стадии наращивания полипептидной цепи. Для этой цели нами был использован “preview”-анализ [42], полученный по результатам секвенирования. Этот метод ныне широко и успешно применяется [43, 44]. Определенные нами средние на стадию твердофазного синтеза PDE $\gamma$  величины “preview” и эффективности составили 0.18 и 99.82% соответственно. Таким образом, полученный в результате 76-стадийного синтеза сырой продукт содержит 87% (0.9982<sup>76</sup>) белка с заданной длиной цепи. Подоб-

ная эффективность сопоставима с описанными в литературе результатами синтеза белков такой сложности и соответствует современному методическому уровню [45].

#### 5. ОЧИСТКА СИНТЕТИЧЕСКОЙ PDE $\gamma$

В ходе хроматографической очистки белка в препаративных масштабах (50–100 мг) мы столкнулись с его необычным поведением: при гель-фильтрации сырого продукта подвижность белка не соответствовала его молекулярной массе. Время удерживания PDE $\gamma$  с молекулярной массой 10 кДа совпадало с временем удерживания альбумина (70 кДа), что указывало на существование агрегатов, как минимум гексамеров. Наличие агрегации синтетического белка было подтверждено данными FPLC (гель-фильтрация на колонке Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia, Швеция)). В полностью денатурирующих условиях (6 М Gu · HCl, pH 2.0) продукт оказался достаточно гомогенным. Сравнительная FPLC белка на обращенной фазе в денатурирующих (рис. 4а) и стандартных условиях (рис. 4б) стала еще одним свидетельством в пользу агрегации.

С учетом полученных данных была использована следующая схема выделения и очистки PDE $\gamma$ : 1) диализ растворенного в 50% уксусной кислоте продукта против, последовательно, 1 и 0.1 М AcOH; 2) ультрафильтрация через Millex-HV, 0.45 мкм (Millipore, США); 3) гель-фильтрация на сефадексе G-50 SF (колонка 26 × 90 мм) в 1 М AcOH; 4) FPLC из 8% CH<sub>3</sub>CN на колонке Pro RPC



**Рис. 4.** FPLC синтетической PDE $\gamma$  (сплошная линия) и выделенного из палочек сетчатки глаза быка холофермента PDE (пунктирная линия). Колонка Pro RPC HR 5/10; элюция в градиенте концентрации  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0–60%) в 0.1% TFA. Образцы растворены в 6 M  $\text{Gu} \cdot \text{HCl}$  (а) и в 8%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (б). Отнесения пиков:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – мономеры соответствующих субъединиц PDE сетчатки глаза быка.

HR 5/10 (Pharmacia, Швеция) в градиенте (0–60%)  $\text{CH}_3\text{CN}$  в 0.1% TFA; 5) обращенно-фазовая ВЭЖХ на колонке (4.1 × 250 мм) Synchronak  $\text{C}_4$  (Alltech, США) в градиенте (0–60%)  $\text{CH}_3\text{CN}$  в 0.1% TFA. После очистки синтетический белок обладал ингибиторной активностью, неотличимой (в пределах погрешности измерений) от активности природного белка. Критерием идентичности белков послужила также сравнительная обращенно-фазовая ВЭЖХ (в описанных выше условиях) препаратов индивидуального природного белка и синтетического, а также их смеси (данные не приведены).

Конечный продукт был охарактеризован с помощью аминокислотного анализа. Синтетичес-

кий белок имел корректную молекулярную массу, по данным масс-спектрометрии, и был гомогенен в условиях капиллярного электрофореза (данные не приведены). Очищенный синтетический белок и его природный аналог были подвергнуты расщеплению бромцианом [46] по трем остаткам Met в положениях 1, 17 и 57. Полученные три ожидаемых фрагмента были идентифицированы хроматографически (хроматограммы гидролизатов природной и синтетической PDE $\gamma$  были практически идентичны – данные не приведены) и дополнительно охарактеризованы аминокислотным анализом.

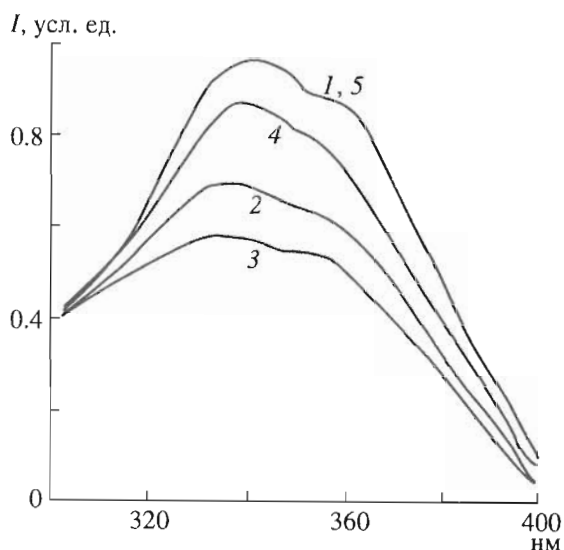


Рис. 5. Влияние катионов  $Zn^{2+}$  на флуоресценцию раствора синтетической PDEу ( $\lambda_{ex}$  280 нм, кювета  $1 \times 1 \times 1$  см). Спектры флуоресценции растворов 1 и 5 полностью идентичны. Составы растворов (указаны экв. по отношению к PDEу): 1) 4 мкМ PDEу в 20 мМ трис-HCl, pH 7.5 (I); 2) 2 мкМ  $ZnSO_4$  (0.5 экв.) в растворе I; 3) 8 мкМ  $ZnSO_4$  (2 экв.) в растворе I (II); 4) 4 мкМ цистеин (1 экв.) в растворе II; 5) 12 мкМ цистеин (3 экв.) в растворе II.

## 6. РЕНАТУРАЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКОЙ PDEу, ЕЕ СВЯЗЫВАНИЕ С $Zn^{2+}$

Весьма гидрофобный С-концевой фрагмент PDEу, обладающий ингибиторной активностью [3, 31], содержит остатки Asp<sup>63</sup>, Cys<sup>68</sup>, His<sup>75</sup> и His<sup>79</sup> (отмечены на рис. 1), занимающие положения, отвечающие консенсусу цинк-связывающего домена в так называемых белках с мотивами цинковых пальцев [47]. Цинк — один из доминирующих микроэлементов в живых тканях. Его количество в организме взрослого человека колеблется от 2 до 3 г. Сейчас известно и детально изучено более 300 цинк-связывающих белков, и число их с каждым годом растет [48–57].

Явное влияние цинка на ренатурацию синтетической PDEу обнаружилось уже в условиях диализа при значениях pH, близких к физиологическим. Так, если подщелачивание водного раствора синтетического белка до pH 7.0 приводило к его осаждению, то при диализе 250 нмоль PDEу в 2 мл 6 M Gu · HCl против 500-кратного объема 20 мМ трис-HCl (pH 8.5), содержащего 0.2–0.6 мМ  $ZnSO_4$ , белок оставался растворимым. Замена в буфере соли цинка на эквивалентное количество EDTA приводила к появлению белкового осадка.

Присутствие единственного в структуре PDEу остатка триптофана Trp<sup>70</sup> в предполагаемом цинк-связывающем домене позволило применить флуориметрию для первичной оценки средства

белка к катионам  $Zn^{2+}$  (рис. 5). При добавлении в раствор синтетической PDEу до 2 экв.  $Zn^{2+}$  наблюдалось тушение флуоресценции белка на 35–37% без изменения формы спектра и положения максимума эмиссии. Введение избытков катионов цинка не приводило к дальнейшему снижению интенсивности флуоресценции. Прибавление к раствору, содержащему PDEу и  $Zn^{2+}$ , цистеина, связывающего катионы цинка с константой порядка  $10^{18}$  [58], восстанавливало уровень флуоресценции до исходного. В контрольных экспериментах ни цистеин, ни катионы  $Zn^{2+}$  (совместно или порознь) не оказывали влияния на интенсивность флуоресценции растворов триптофана, Вос-Trp-NH<sub>2</sub> и ряда триптофансодержащих пептидов в сравнимых с PDEу концентрациях (данные не приведены).

Эти данные позволяют сделать вывод, что PDEу действительно специфически связывает катионы  $Zn^{2+}$ . Поскольку длина волны максимума флуоресценции остатка Trp не меняется, возникающие при взаимодействии с цинком конформационные изменения в PDEу, по-видимому, не приводят к изменению гидрофобности ближайшего окружения этого хромофора, а только приближают к нему тушащие группы [59, 60].

Следует заметить, что в большинстве описанных в литературе экспериментов по влиянию катионов  $Zn^{2+}$  на флуоресценцию растворов пептидов со структурами цинковых пальцев из ДНК-связывающих белков [61–63] наблюдалось, напротив, усиление интенсивности флуоресценции при взаимодействии с цинком, т.е. удаление тушащих групп от находящегося поблизости остатка Trp, но также без изменения формы спектра и положения максимума эмиссии (и соответственно без изменения гидрофобности окружения этого хромофора).

Эти наблюдения указывают на возможную роль ионов цинка в функционировании фосфодиэстеразы. Следует отметить, что сетчатка глаза характеризуется повышенным содержанием  $Zn^{2+}$  — около 570 мкг на 1 г сырой ткани по сравнению с 10–200 мкг/г в большинстве других тканей [57]. На наш взгляд, дальнейшая экспериментальная проверка этой гипотезы представляет несомненный интерес, особенно ввиду известного непосредственного участия  $Zn^{2+}$  во взаимодействии регуляторных и каталитических субъединиц некоторых ферментов [55].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: DCC, карбобензокси-хлорид (Z-Cl), аминотетрагидрофурановый полистирол (PS), защищенные аминокислоты — фирмы Peptide Institute Inc. (Япония); дитиотреит, DIEA, DMAP, Вос<sub>2</sub>O, DCNA, HOBT, DIC, Me<sub>3</sub>Si, PhSMc, трис, бензилхлорметилловый эфир, AcIm, тиокре-



зол, 1,2-этандитиол,  $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NH}$ , HF, нингидрин, TfI-OH, Рас-Br – фирмы Fluka (Швейцария). Остальные растворители и реактивы – отечественного производства фирмы “Реахим” квалификации х. ч. или ос. ч., которые в случае необходимости очищали в соответствии с описанными методиками [64].

Удельное вращение измеряли на спектрополяриметре Perkin-Elmer 141 M (США). Аминокислотный анализ проводили по стандартной программе на анализаторе Biotronik High Performance Amino Acid Analyzer LC 5001 (Германия). В работе использовали титратор фирмы Radiometer (Дания). Температуры плавления определяли на термомплавильном столике фирмы Voetius (Германия), аминокислотную последовательность – на секвенаторе ABI 477A фирмы Applied Biosystems (США), элементный анализ выполняли на приборе Hewlett-Packard 185 В CHN-analyzer (США). Обработку HF проводили в HF-аппарате фирмы Multiple Peptide Systems (США), адаптированном для работы с одним образцом пептидполимера. Применяли приборы и мембраны для ультрафильтрации (Millipore и Amicon, США), сефадексы и стандарты молекулярных весов (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция). ТСХ проводили на пластинках с силикагелем Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck, Германия), для препаративной хроматографии применяли силикагель L 40/100 (Chemapol, Чехия). Масс-спектры регистрировали на приборе API III Taga 6000E Ionspray (Канада). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi MPF-3 (Япония).

**Стандартные процедуры.** *трет*-Бутиловый спирт дополнительно очищали двухкратным вымораживанием при 4°C. На стадиях нейтрализации в твердофазном синтезе использовали свежеприготовленный раствор 5% DIEA в DCM. Неводные растворы высушивали над  $\text{MgSO}_4$  и упаривали на роторном испарителе.

**Вос-Abu-OH** синтезировали по методу [64], кристаллизовали из смеси EtOAc–гексан. Выход 91%, т. пл. 49–50°C (по данным [64], 48–52°C).

**Вос-Gln(Xan)-OH** [10]. Вос-Gln-OH и ксангидрол (Xan-OH) (по 50 ммоль) растворяли при интенсивном перемешивании и температуре 80°C в 80 мл ледяной AcOH. Перемешивание продолжали при 80°C еще 1 ч, затем раствор охлаждали до 20°C, добавляли к нему 400 мл воды и оставляли на 18 ч при 4°C. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали 300 мл воды, растворяли в минимальном объеме EtOAc (около 300 мл), отделяли водный слой и экстрагировали его EtOAc (50 мл  $\times$  3). Суммарный органический слой высушивали, упаривали до объема 200 мл, добавляли гексан (до легкого помутнения раствора) и оставляли на льду на 2 ч. Осадок отфильтровывали и промывали небольшим количеством гексана.

Выход 52%, т. пл. 148–152°C (по данным [10], 149–153°C).

**$\text{CF}_3\text{COOPf}$**  [65]. Смесь 50 ммоль Pfr-OH и 75 ммоль  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$  перемешивали 18 ч в атмосфере инертного газа при 40°C. Реакционную смесь перегоняли, собирая бесцветную жидкость с т. кип. 122°C. Выход 87%.

**Pfr-эфиры Вос-аминокислот** синтезировали по методу [66] исходя из DCC и Pfr-OH, используя в качестве растворителя EtOAc или DMF (при синтезе Вос-Gln(Xan)-OPfr). Кристаллизовали из смеси EtOAc–гексан или из гексана (при синтезе Вос-Gly-OPfr). Выходы (%): Вос-Abu-OPfr – 85, Вос-Gly-OPfr – 80, Вос-Tyr(2-Br-Z)-OPfr – 80, Вос-Gln(Xan)-OPfr – 78, Вос-Ala-OPfr – 85. Более удобной и эффективной оказалась другая методика [65], несколько модифицированная нами. К раствору 0.5 ммоль Вос-аминокислоты в 1 мл DMF или DCM добавляли 0.55 ммоль пиридина и 0.58 ммоль  $\text{CF}_3\text{COOPf}$ . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, следя за ходом реакции с помощью ТСХ. Как правило, уже через 15 мин исходная аминокислота полностью превращалась в активированное производное. С равным успехом в реакцию можно вводить и непосредственно DCHA-соли Вос-аминокислот в присутствии 0.1 экв. пиридина. По окончании реакции смесь разбавляли 100 мл EtOAc, трижды промывали 100 мл 0.1 М HCl, затем трижды 100 мл 5%  $\text{NaHCO}_3$ , высушивали и упаривали досуха. Полученный твердый белый остаток, однородный по данным ТСХ, использовался далее без дальнейшей очистки.

**Su-эфиры Вос-аминокислот** синтезировали по методу [67], кристаллизовали из изопропанола. Выходы (%): Вос-Pro-OSu – 78, Вос-Gly-OSu – 75.

**Me-эфиры аминокислот** получали по опубликованным методикам [68, 69], перекристаллизовывали из смеси MeOH–Et<sub>2</sub>O. Выходы, % (т. пл., °C): HCl · H-Gly-OMe – 90 (175–177), HCl · H-Pro-OMe – 95 (71–72).

**Вос-His(Bom)-OH** получали по методикам [16]. Вос-His(Вос)-OMe кристаллизовали из гексана (выход 90%, т. пл. 96°C); HCl · Вос-His(Вос)-OMe кристаллизовали из смеси MeOH–Et<sub>2</sub>O, 1 : 10 (выход 70%, т. пл. 151°C); Вос-His(Вос)-OH экстрагировали  $\text{CHCl}_3$ , кристаллизовали из EtOAc (выход 82%, т. пл. 155°C).

**Вос-Arg(Z)<sub>2</sub>-OH**. К суспензии 15 ммоль моногидрата Вос-Arg-OH · HCl в 50 мл THF прибавляли 90 ммоль  $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NH}$ , реакционную смесь кипятили до полного растворения Вос-аминокислоты. Полученный однородный раствор упаривали досуха, остаток обрабатывали 75 ммоль DIEA в 30 мл DCM, а затем осторожно прибавляли 60 ммоль  $\text{Me}_3\text{SiCl}$ . Реакционную смесь кипятили 1.5 ч, охлаждали до 0°C, прибавляли в один прием 45 ммоль карбобензоксихлорида (Z-Cl), медленно поднимали температуру до комнатной и продол-

жали перемешивание в течение ночи. После упаривания остаток растворяли в 100 мл MeOH, перемешивали 15 мин и снова упаривали. Бесцветное масло растворяли в 500 мл Et<sub>2</sub>O, отмывали последовательно 2.5% NaHSO<sub>4</sub> и водой, высушивали и упаривали, затвердевший продукт промывали гексаном. Выход 70%, т. пл. 140–142°C (по данным [22], 141–142°C).

**Me-эфиры Вос-дипептидов** [68, 69]. Хлоргидрат метилового эфира аминокислоты (32 ммоль) растворяли в присутствии 32 ммоль N-метилморфолина в 100 мл DCM или CH<sub>3</sub>CN (DMF в синтезе Вос-Gln(Xan)-Gly-OMe), прибавляли 32 ммоль Вос-аминокислоты и 40 ммоль DCC, предварительно охладив реакционную смесь до –10°C. Перемешивали 2 ч при –10°C, оставляли на ночь при 20°C. Выпавшую DCU отделяли фильтрованием, растворитель упаривали, а оставшееся масло растворяли в 200 мл EtOAc, затем последовательно промывали 1 M HCl, водой, 1 M NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным раствором NaCl. Органическую фазу высушивали и упаривали. Остаток растирали с петролейным эфиром до затвердения и кристаллизовали из смеси EtOAc и петролейного эфира или хроматографировали в CHCl<sub>3</sub> на короткой колонке с силикагелем L 40/100. Выходы, % (т. пл., °C): Вос-Gln(Xan)-Gly-OMe – 80 (213), Вос-Leu-Gly-OMe – 90 (137), Вос-Phe-Gly-OMe – 87 (71), Вос-Ile-Pro-OMe – 95 (масло), Вос-Lys(2-Cl-Z)-Gly-OMe – 91 (масло).

**Вос-Pro-Pro-OH и Вос-Gly-Pro-OH** [70]. К раствору 11 ммоль пролина в 20 мл 2 M NaOH добавляли раствор 10 ммоль Вос-Pro-OSu или Вос-Gly-OSu в 20 мл THF. Реакционную массу перемешивали 18 ч при комнатной температуре, после чего растворитель удаляли в вакууме, а остаток растворяли в смеси 100 мл EtOAc и 50 мл 10% лимонной кислоты. Органический слой отделяли, промывали 40 мл насыщенного раствора NaCl, высушивали и упаривали. Кристаллизовали из смеси EtOAc и петролейного эфира. Выходы, % (т. пл., °C): Вос-Pro-Pro-OH – 75 (177), Вос-Gly-Pro-OH – 78 (146).

**Омыление Me-эфиров Вос-дипептидов** [71]. 10 ммоль Me-эфира Вос-дипептида растворяли в 500 мл смеси TEA–MeOH–H<sub>2</sub>O (1 : 2 : 2) и перемешивали 3 ч. Упаривали, добавляли по 100 мл этилацетата и воды, подкисляли до pH 3.0 добавлением 2 M HCl. Экстрагировали этилацетатом, отмывали водой, высушивали и упаривали, кристаллизовали из Et<sub>2</sub>O или из смеси EtOAc–гексан. Выход составлял 80–95%. Т. пл. (°C): Вос-Gln(Xan)-Gly-OH – 201, Вос-Leu-Gly-OH – 119, Вос-Phe-Gly-OH – 161, Вос-Lys(2-Cl-Z)-Gly-OH – масло, DCHA-соль Вос-Ile-Pro-OH – 123.

**Br-MPA-OPac** [7]. К интенсивно перемешиваемой суспензии 0.13 моль Pac-Br в 500 мл CH<sub>3</sub>CN, содержащей 0.39 моль мелкодисперсного KF · H<sub>2</sub>O, прибавляли при комнатной температуре шестью

равными порциями с интервалом в 30 мин синтезированный по методике [10] Br-MPA-OH (всего 0.13 моль). По окончании реакции осадок нерастворенных солей отфильтровывали, к раствору добавляли по 500 мл эфира и воды. Эфирный слой отделяли, промывали водой (500 мл × 2), высушивали и упаривали. Полученный остаток растворяли в 65 мл DCM и прибавляли пентан до появления при нагревании устойчивого помутнения. После стояния при 4°C в течение 3 сут кристаллический продукт отфильтровывали, промывали смесями DCM–пентан (15 мл : 45 мл, затем 15 мл : 75 мл), затем 60 мл пентана, высушивали в вакууме. Выход 55%, т. пл. 86–88°C.

**Вос-Ile-OMPA-OPac** [7]. К раствору 10 ммоль Br-MPA-OPac и 11 ммоль Вос-Ile-OH в 60 мл CH<sub>3</sub>CN при интенсивном перемешивании прибавляли 20 ммоль мелкодисперсного KF · H<sub>2</sub>O. Реакционную смесь перемешивали 64 ч при комнатной температуре. Отделяли нерастворенные соли, прибавляли по 120 мл EtOAc и воды. Водный слой экстрагировали EtOAc (100 мл × 2), суммарный органический слой отмывали водой (120 мл × 3). Непрореагировавшую Вос-Ile-OH отмывали буферным раствором с pH 9.5 (170 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 330 mM NaHCO<sub>3</sub>). После высушивания органический слой упаривали досуха. Выход количественный. Продукт использовали без очистки.

**Вос-Ile-OMPA-OH** получали из Вос-Ile-OMPA-OPac по методу [7]. Выход 80%.

**Вос-Ile-OMPA-Abu-PS** [8]. Аминометилированный PS (2 г, исходная загрузка 0.74 ммоль NH<sub>2</sub>-групп на 1 г) помещали в силиконированную колбу, снабженную трехходовым краном с фильтром. Синтез осуществляли по протоколу, представленному в табл. 2, поочередно прибавляя и удаляя реагенты при комнатной температуре (если другая не оговорена). После этого Вос-Ile-OMPA-Abu-PS отмучивали в CHCl<sub>3</sub>. Полимер высушивали и измеряли его загрузку пикриновым методом [72]. Загрузка полимера составила 0.694 ммоль/г после присоединения Вос-Abu- (шаг 14, при теоретически возможной 0.7 ммоль/г, масса оставшегося после отмучивания полимера 1.67 г) и 0.551 ммоль/г после присоединения Вос-Ile-OMPA-OH (шаг 22, при теоретически возможной 0.553 ммоль/г).

**Синтез PDEy (второй вариант синтеза)** проводили в ручном проточном реакторе (светлографе) с контролем за ходом реакций конденсации, промывок и деблокирования по выходу на плато сигнала самописца, связанного с детектором, фиксирующим изменение объема помещенного в реактор полимера [5]. Для синтеза был взят 1.1 г Вос-Ile-OMPA-Abu-PS с загрузкой 0.551 ммоль/г.

Синтез осуществляли при комнатной температуре в соответствии с протоколом, представленным в табл. 1 и 3. После конденсации последней аминокислоты пептидилполимер промывали,

Таблица 2. Протокол синтеза Вос-Ile-OMPA-Abu-PS

Шаг	Операция	Реагенты	Объем, мл	Время
1	Промывка	DCM	5 (×3)	По 2 мин
2	Нейтрализация	5% DIEA в DCM	5	2 мин
3	Промывка	DCM	5 (×2)	По 2 мин
4	Присоединение Вос-Abu-остатка	50% Вос-Abu-OPfr и 20% HOBt в DMF (по 2 экв. в расчете на NH <sub>2</sub> -PS)	2	Ночь
5	Промывка	DCM	5 (×2)	По 2 мин
6	Сжимающая промывка	20% Bu <sup>t</sup> OH в THF	5 (×2)	По 2 мин
7	Нейтрализация	5% DIEA в DCM	5	2 мин
8	Промывка	DMF	5 (×2)	По 2 мин
9	Повторное присоединение Вос-Abu-	50% Вос-Abu-OPfr и 20% HOBt в DMF (по 2 экв. в расчете на NH <sub>2</sub> -PS)	2	Сутки
10 <sup>1</sup>	Нейтрализация и промывки	Шаги 6–8		
11	N <sup>α</sup> -Деблокирование	50% TFA и 0.1% индол в DCM	10	30 мин
12	Промывка	DCM	5 (×3)	По 1 мин
13	Нейтрализация	5% DIEA в DCM	5 (×2)	По 2 мин
14 <sup>2</sup>	Промывка	DCM	5 (×2)	По 1 мин
15	»	DCM	5 (×2)	По 1 мин
16 <sup>3</sup>	Присоединение Вос-Ile-OMPA-OH а) введение Вос-производного б) активация	73% Вос-Ile-OMPA-OH в DCM (3 экв. в расчете на NH <sub>2</sub> -PS) 1.6 г/мл DCC в DCM (3 экв. в расчете на NH <sub>2</sub> -PS)	2 0.5	5 мин 72 ч
17 <sup>1</sup>	Промывки и нейтрализация	Шаги 12–14		
18	Повторное присоединение Вос-Ile-OMPA-OH	Шаги 15 и 16 при 35°C		72 ч
19 <sup>1</sup>	Промывки и нейтрализация	Шаги 12–14		
20 <sup>4</sup>	Завершающее присоединение Вос-Ile-OMPA-OH	Шаги 15 и 16		1 ч
21	Промывка	DCM	5 (×2)	По 2 мин
22 <sup>2</sup>	Блокирование непрореагировавших аминогрупп PS (кэпирование)	Ac <sub>2</sub> O	2	2 ч

<sup>1</sup> После шагов 10, 17 и 19 определяли полноту конденсации качественным нингидриновым тестом Кайзера [12] (см. прим. 5 к табл. 1). В случае неудовлетворительного выхода реакции после шага 10 возвращались к шагу 9, инкубируя суспензию полимера при 38°C в течение ночи. Затем к смеси добавляли 40 мкл DMAP и 50 мкл DIEA (по 0.1 экв. в расчете на Вос-Abu-OPfr) и продолжали инкубацию 30 мин при комнатной температуре. Далее повторяли шаги 6–8.

<sup>2</sup> После шагов 14 и 22 полимер отмучивали в CHCl<sub>3</sub>, высушивали в вакууме до постоянной массы, взвешивали и определяли его загрузку (см. “Эксперим. часть”, синтез Вос-Ile-OMPA-Abu-PS).

<sup>3</sup> На шаге 16(б) активирующий раствор добавляли, не удалив предварительно раствор Вос-Ile-OMPA-OH, добавленный на шаге 16(а).

<sup>4</sup> В смесь также добавляли 150 мкл DMAP и 220 мкл DIEA (по 1 экв. в расчете на NH<sub>2</sub>-PS), инкубировали 1 ч при комнатной температуре.

выполняя шаги 1–3 по табл. 1, выгружали из реактора и, высушив до постоянной массы (4.925 г), измеряли загрузку, которая составила 0.07 ммоль/г (при теоретически возможной 0.065 ммоль/г).

**Удаление N-концевой Вос-защитной группы с пептидилполимера.** Хорошо промытый и высушенный пептидилполимер (0.5 г) помещали в силиконированную колбу, добавляли 20 мл раствора 50% TFA и 0.1% индола в DCM и перемешивали 40 мин. Пептидилполимер отфильтровывали и промывали как при синтезе Вос-Ile-OMPA-Abu-PS, но в соответствии с протоколом табл. 1 (выполнили трижды шаг 3, далее по 2 раза шаги 7, 3 и 1).

**Ацетилирование N-концевого метионина пептидилполимера [10].** Пептидилполимер помещали в 2 М раствор AcIm (20-кратный молярный избыток по пептиду) в DMF и выдерживали 2 ч, периодически встряхивая. Полимер отмывали, выполняя шаги 5–7 по табл. 1, после чего повторяли описанные операции, заменив DMF на DMA. Далее реагенты удаляли, пептидилполимер отмывали, выполняя шаги 2, 12, 2 и 5 по табл. 1, и высушивали в вакууме. Для получения меченой PDE $\gamma$  в качестве ацетилирующего агента вместо AcIm использовали [<sup>14</sup>C]Ac<sub>2</sub>O.

**Me<sub>3</sub>SiO-TfI.** В трехгорлую колбу, снабженную магнитной мешалкой, обратным холодильником

Таблица 3. Условия конденсаций в твердофазном синтезе PDEy

Стадия синтеза	Вос-производное	Условия конденсаций (количество Вос-производного, моль на моль пептида/метод активации <sup>1</sup> /время, ч)			
		1-я	2-я	3-я	4-я
1	Ile	4/A/2	2/A/48	2/B/18	2/B <sup>2</sup> /2
2	Gly	4/B/4	4/B/18	—	—
3	Tyr(2-Br-Z)	2/B/1	2/B/1	2/B/18	—
4	Gln	4/B/1	4/B/1	4/B/18	—
5	Ala	3/A/1	2/A/2.5	2/A/2.5	—
6	Leu	2/A/24	2/A/18	—	—
7	Glu(OcHx)	2/B/2	2/B/1.5	2/B/18	2/A/2
8	His(Bom)	2/B <sup>3</sup> /2	2/B <sup>3</sup> /2	1/B <sup>3</sup> /18	2/A/2
9	Leu	2/A/1	2/A/3	2/B/48	—
10	Glu(OcHx)	2/B/3	2/B/1.5	2/A/18	—
11	Leu	2/A/2	2/A/3	—	—
12	His(Bom)	2/B/0.6	2/B/18	2/A <sup>4</sup> /3	—
13	Asn	2/B/2	2/B/18	—	—
14 <sup>5</sup>	Phe	2/A/0.6	2/B/3	—	—
15	Ala	2/A/3	2/A/1	2/B/18	—
16	Glu(OcHx)	2/A/2	2/A/18	2/B/4	—
17	Trp(For)	2/A/18	3/A/6	—	—
18	Pro	3.5/A/18	2/A/6	—	—
19	Cys(Acm)	2/A/1	2/A/18	3/B/4	—
20	Ile	2/A/2	2/A/3	2/B/18	—
21	Val	2/A <sup>3</sup> /3	2/A/2	2/B/18	—
22	Thr(Bzl)	2/A <sup>6</sup> /20	2/A/18	2/B/24	2/B <sup>2</sup> /18
23	Ile	2/A/1.5	2/A/2	2/B/18	—
24	Asp(OcHx)	2/A/1.5	2/A/2	2/B/18	—
25	Thr(Bzl)	2/A/2	2/B/18	2/A/18	—
26	Leu-Gly	1/A <sup>6</sup> /2	3/B/18	3/B/18	—
27	Gly	2/B/1	2/B/3	3/B/18	—
28 <sup>7</sup>	Glu(OcHx)	2/B/3	2/B/18	2/A/18	—
29	Met(O)	2/A/0.6	3/A/18	—	—
30	Gly	4/B/2	4/B/48	—	—
31	Ile-Pro	2/B/1	2/B/18	—	—
32	Asp(OcHx)	3/B/3	3/B/1	2/A/18	—
33	Asp(OcHx)	3/B/4	3/B/2	2/A/18	—
34	Phe-Gly	2/B/2	2/A/18	2.5/B/18	—
35	Gln(Xan)-Gly	1.5/B/3	2/B <sup>8</sup> /2 + 1	3/B <sup>4,8</sup> /18 + 24	—
36	Val	4/A <sup>8</sup> /0.3 + 2.7	4/A <sup>8</sup> /0.3 + 2.7	4/A <sup>8</sup> /0.3 + 18	4/B/18
37	Lys(2-Cl-Z)-Gly	2/B <sup>8</sup> /0.6 + 0.4	3/B <sup>8</sup> /18 + 0.3	2/B <sup>8</sup> /5 + 0.3	—
38	Lys(2-Cl-Z)	1/A <sup>6</sup> /18	3/B/5	3/B/18	—
39	Pro-Pro	2/B/2	3.5/B/5	2/A/48	—
40	Lys(2-Cl-Z)	2/B/0.6	2/B/3	4/B <sup>8</sup> /18 + 0.3	—
41	Ser(Bzl)	2/B/2	2/B/18	2/B/24	—
42	Lys(2-Cl-Z)	2/B/1	2/B <sup>8</sup> /2 + 0.3	2/B <sup>8</sup> /18 + 0.3	—
43	Phe	3/A <sup>6</sup> /1	2/A <sup>8</sup> /2 + 0.3	3/B/18	—
44	Gln	3/B/0.6	3/B/48	—	—
45 <sup>9</sup>	Arg(Tos)	6/B/0.6	6/B/18	—	—
46	Thr(Bzl)	2/B/1	4/B/18	—	—
47	Gln	3/B/0.6	5/B/2	5/B/18	—
48	Arg(Tos)	6/B/0.6	6/B/2	6/B/18	—
49	Gln	4/B/0.6	6/B/5	6/B/18	—
50	Lys(2-Cl-Z)	2/A/0.6	3/A/4	3/B/18	—
51	Phe	3/A/0.6	4/B/3	3/A/18	—

Таблица 3. (Окончание)

Стадия синтеза	Вос-производное	Условия конденсаций (количество Вос-производного, моль/моль пептида/метод активации <sup>1</sup> /время, ч)			
		1-я	2-я	3-я	4-я
52	Lys(2-Cl-Z)	2/Б <sup>8</sup> /0.6 + 0.3	2/Б/3	3/Г/18	—
53	Pro-Pro	2/Б/18	2/Б/2	4/Б/18	—
54 <sup>10</sup>	Lys(2-Cl-Z)-Gly	2/Б <sup>8</sup> /0.3 + 0.3	5/Б <sup>8</sup> /18 + 0.3	—	—
55	Arg(Tos)	6/Б/3	6/Б <sup>4</sup> /18	6/Б <sup>8</sup> /4 + 0.3	6/Б/48
56	Pro	3/А/1	3/А/3	6/А/18	—
57	Thr(Bzl)	2/Б/1	3/Б/4	6/Б/18	—
58	Val	2/А/1	4/А/2	6/А/18	6/Б/18
59	Gly-Pro	3/Б/2	5.5/Б <sup>8</sup> /18 + 0.3	—	—
60	Gly	3/Б/2	6/Б/2	6/Г/48	—
61 <sup>11</sup>	Met(O)	2/Б/0.6	4/Б/2.5	6/Б/18	3/А <sup>2,8</sup> /3 + 0.3
62	Val	6/А/0.6	6/А/2	6/Б <sup>2</sup> /3	3/А <sup>2</sup> /48
63	Arg(Tos)	4/Б/0.6	6/Б/18	6/Б <sup>2</sup> /18	—
64	Thr(Bzl)	3/Б/0.6	3/Б <sup>8</sup> /2 + 0.3	3/Б/18	—
65 <sup>12</sup>	Ala	4/А/0.6	4/А <sup>8</sup> /2.5 + 0.3	—	—
66	Ser(Bzl)	2/А/2	4/Б/18	—	—
67	Arg(Tos)	6/Б/3	6/Б/3	6/Б/18	—
68	Ile	3/А <sup>8</sup> /0.3 + 0.3	5/Б/16	3/А <sup>2</sup> /3	5/Б <sup>8</sup> /18 + 0.3
69	Glu(OcHx)	3/А/1	6/Б <sup>8</sup> /2 + 0.3	3/Б <sup>2</sup> /18	—
70	Ala	3/А <sup>6,8</sup> /0.6 + 0.3	6/А <sup>8</sup> /2.5 + 0.3	6/Б <sup>2,8</sup> /18 + 0.3	—
71	Lys(2-Cl-Z)	3/Б/1	3/Б/1.5	4/Г/18	—
72	Pro-Pro	1.5/А <sup>6</sup> /1	6/Б/18	4/Б/2	—
73	Glu	2/А <sup>6</sup> /1	6/Б/18	4/Б <sup>2</sup> /2.5	—
74	Leu	6/А <sup>6</sup> /0.6	6/А/18	—	—
75	Asn	6/Б/0.8	6/Б/2	6/Б <sup>2</sup> /18	6/Б/0.8
76	Met(O)	2/Б <sup>6</sup> /2	4/Б/1.5	4/Б <sup>2</sup> /18	—

<sup>1</sup> Методы активации (растворы готовили непосредственно перед подачей в реактор):

А (симметричные ангидриды): навеску 1 экв. DCC растворяли в 2 экв. 0.5 М раствора Вос-производного в DCM, выдерживали 20 мин при 0°C, после чего упаривали почти досуха. Остаток растворяли в DMF (или в DMA в случае 2-й и последующих конденсаций), отфильтровывали образовавшийся осадок DCU, добавляли до половины исходного объема DMF (или DMA) для получения 1 экв. 0.5 М раствора симметричного ангидрида Вос-производного.

Б (НОВт-эфиры): навески 1 экв. DCC и 2 экв. НОВт растворяли в 1 экв. 0.5 М раствора Вос-производного в DMF (или в DMA в случае 2-й и последующих конденсаций), выдерживали 20 мин при 0°C, после чего отфильтровывали образовавшийся осадок DCU. Получали 1 экв. 0.5 М раствора активированного Вос-производного.

В (DIC): смешивали 1 экв. DIC с 1 экв. 0.5 М раствора Вос-производного в DCM. Для предшествующей промывки на шаге 12 (см. табл. 1) также использовали DCM вместо DMA.

Г (Pfr-эфиры): навеску 1 экв. НОВт растворяли в 1 экв. 0.5 М раствора Pfr-эфира Вос-производного в DMF. Для предшествующей промывки на шаге 12 (см. табл. 1) также использовали DMF вместо DMA.

<sup>2</sup> Перед подачей раствора полимер высушивали прокачиванием через реактор аргона.

<sup>3</sup> Через 1 ч после начала конденсации добавляли 0.5 экв. DIC (в расчете на пептидилполимер).

<sup>4</sup> Вос-производное растворяли в смеси DMSO–DMF (1 : 4). Этой же смесью вместо DMA осуществляли предшествующую промывку на шаге 12 (см. табл. 1).

<sup>5</sup> По завершении этой стадии полимер удаляли из реактора, промывали избытком CHCl<sub>3</sub> или DCM, высушивали, взвешивали, определяли загрузку с помощью спектрофотометрического титрования пикриновой кислотой [72], после чего отмучивали в CHCl<sub>3</sub>. Масса полимера составила 2.3 г (при теоретически возможной 2.5 г). В следующую стадию взяли 2.228 г.

<sup>6</sup> Через 20 мин после начала конденсации добавляли 0.5 экв. DIC (в расчете на пептидилполимер).

<sup>7</sup> См. прим. 5. Масса полимера составила 3.04 г, в следующую стадию взяли 2.88 г.

<sup>8</sup> По истечении первого указанного отрезка времени добавляли 0.1 экв. DMAP (в расчете на активированное Вос-производное), после чего продолжали конденсацию в течение второго отрезка времени.

<sup>9</sup> См. прим. 5. Масса полимера составила 3.987 г, в следующую стадию взяли 3.946 г.

<sup>10</sup> См. прим. 5. Масса полимера составила 5 г, в следующую стадию взяли 3.9 г.

<sup>11</sup> На этой стадии проводили и 5-ю конденсацию в 0.5 М растворе симметричного ангидрида, (Вос-Met(O))<sub>2</sub>O, в DCM по схеме: 3/А<sup>2,8</sup>/18 + 0.3 (см. заголовок табл. 3). Для предшествующей промывки на шаге 12 (см. табл. 1) также использовали DCM вместо DMA.

<sup>12</sup> См. прим. 5. Масса полимера составила 4.396 г, в следующую стадию взяли 4.365 г.

с хлоркальциевой трубкой, капельной воронкой и вводом для инертного газа, помещали 1 моль Tfl-OH. Охлаждая колбу в бане со льдом, при интенсивном перемешивании, по каплям, не допуская вскипания реакционной смеси, прибавляли 1.5 моль  $Me_4Si$ . По окончании прибавления перемешивание продолжали еще 1 ч в токе инертного газа, затем продукт отгоняли в вакууме. Выход 91%. Т. кип. 39–40°C (11 мм рт. ст.).

**Отщепление пептида от полимерной подложки раствором  $Me_3SiO-Tfl$  в TFA [29].** В силиконированную колбу, снабженную магнитной мешалкой, помещали 1 г хорошо промытого, отмученного и высушенного пептидилполимера, 70 мг триптофана и 40 мг цистеина. Колбу заполняли инертным газом и в противотоке прибавляли 10 мл раствора, содержащего по 10 ммоль PhSMe, 1,2-этандитиола и *мета*-крезола в TFA. Охлаждая колбу с реагентами в ледяной бане, быстро добавляли 10 ммоль  $Me_3SiO-Tfl$ . Реакцию проводили при интенсивном перемешивании 1.5 ч при 0°C и 1 ч при 20°C. Полимер отфильтровывали и промывали TFA (7 мл × 3). Объединенные фильтраты упаривали в вакууме при температуре не выше 15°C. Пептид осаждали добавлением к маслообразному остатку 250 мл 1% 2-меркаптоэтанола в абсолютном  $Et_2O$ , осадок центрифугировали и промывали 250 мл холодного абсолютного  $Et_2O$  (эту процедуру проводили трижды), затем высушивали в вакууме над KOH. Осадок растворяли в минимальном объеме (около 100 мкл на 1 мг пептида) воды или, при наличии в пептиде незащищенных остатков Met и Cys (как и в случае PDEy), 10% раствора 2-меркаптоэтанола. Доводили pH раствора до 8.0–8.5 с помощью 5% аммиака или TEA (PDEy при этом выпадала в осадок), после чего добавляли 5–10 экв. (по отношению к пептиду) 1 M  $NH_4F$  и инкубировали 30–60 мин при 0°C. Доводили pH раствора до 5.0 добавлением 1 M AcOH, после чего пептид обессоливали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 SF и лиофилизовали.

В первом варианте синтеза PDEy высушенный осадок полипептида после  $Et_2O$  растворяли в минимальном объеме ледяной AcOH, разбавляли водой до 1 M AcOH и добавляли 5% TEA до pH 8.0. Несмотря на выпадение пептида в осадок, суспензию тем не менее обрабатывали  $NH_4F$ , как описано выше. Осадок растворяли добавлением ледяной AcOH и воды (конечный раствор 60 мл 1 M AcOH) и подвергали ультрафильтрации через мембрану YM-5. Объем остатка доводили до 5 мл 1 M AcOH и обессоливали на колонке (2.5 × 100 см) с сефадексом G-50 SF. Полученный таким образом пептид лиофилизовали. Выход составил 60% от теоретического.

**Отщепление пептида от полимерной подложки методом HF-“low-high” [33].** К 0.7 г хорошо промытого и высушенного пептидилполимера

добавляли 50 мг триптофана, 25 мг цистеина, 0.950 мл *мета*-крезола, 0.315 г тиюкрезола и 8.2 мл  $Me_2S$ . В эту смесь при охлаждении конденсировали 3 мл HF. Перемешивали 2 ч при 0°C, после чего  $Me_2S$  тщательно удаляли в вакууме. В смесь конденсировали 15 мл HF и продолжали реакцию 1 ч при 0°C. После удаления HF остаток растирали с 50 мл абсолютного эфира (дважды), переносили на фильтр Шотта и промывали эфиром (10 мл × 7). Осадок на фильтре обрабатывали 50% AcOH (5 мл × 4). Суммарные водные вытяжки помещали в диализный мешок Spectropore 6 и диализовали против 1 M AcOH, затем против 0.1 M AcOH. Диализ прекращали, когда УФ-поглощение диализного буфера переставало возрастать за счет выхода в него УФ-непрозрачных соединений. Содержимое диализного мешка фильтровали через Millex-HV (0.45 мкм) и лиофилизовали. Масса оставшегося полимера 130 мг. Масса лиофилизованного пептида 390 мг (выход 90%).

**Осаждение синтетической PDEy этанолом.** Обессоленный образец синтетической PDEy (10 мг) растворяли в минимальном объеме 6 M  $Gu \cdot HCl$ , добавляли до появления легкого помутнения абсолютный этанол и оставляли на 18 ч при 0°C. Раствор осветляли центрифугированием (осадок отбрасывали), добавляли девять объемов абсолютного этанола и собирали осадок пептида центрифугированием.

**Асм-группы с остатков Cys удаляли диацетатом ртути по модифицированной методике [39].** Пептид (7 мкмоль) растворяли в 7 мл смеси AcOH–глицерин–формамид (3 : 3 : 1). После прибавления 9 мг (28 мкмоль)  $(AcO)_2Hg$  реакционную смесь перемешивали 1 ч при комнатной температуре, добавляли 22 мкл (280 мкмоль) 2-меркаптоэтанола и перемешивали еще 1 ч. Реакционную смесь фильтровали через целит и диализовали в Spectropore 6 против 6 M  $Gu \cdot HCl$ .

**Дополнительное деформирование остатков Tgr проводили по модифицированной методике [38].** Пептид (7 мкмоль) растворяли в 30 мл 6 M  $Gu \cdot HCl$  и охлаждали в ледяной бане. При интенсивном перемешивании добавляли 12 мл 2-метиламиноэтанола, перемешивание продолжали 5 мин при 0°C. Подкисляли реакционную смесь до pH 6.0 добавлением 6 M HCl и обессоливали ультрафильтрацией на мембране YM-5 с последующим диализом.

Авторы выражают признательность А.И. Поляковой за участие в хроматографической очистке пептидов, Х.Г. Мурадову за определение функциональной активности PDEy, Т.А. Мурановой за определение аминокислотных последовательностей, Л.Ф. Марковой за аминокислотные анализы, М.Б. Бару за приборный дизайн, И.А. Куделиной за регистрацию спектров флуоресценции и КД, Клаусу Рентелю (Институт органической химии

университета г. Тюбингена, Германия) за регистрацию масс-спектра.

Работа В.Е. Заграничного поддержана международной программой Медицинского института Говарда Хьюза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ovchinnikov Yu.A., Lipkin V.M., Kumarev V.P., Gubonov V.V., Khrantsov N.V., Akhmedov N.B., Zagranichny V.E., Muradov Kh.G.* // FEBS Lett. 1986. V. 204. P. 288–292.
2. *Takemoto D.J., Cunnik J.M.* // Cell. Sign. 1990. V. 2. P. 99–104.
3. *Lipkin V.M., Bondarenko V.A., Zagranichny V.E., Dobrynina L.N., Muradov Kh.G., Natochin M.Yu.* // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1176. P. 250–256.
4. *Kroll S., Phillips J., Cerione R.A.* // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 4490–4497.
5. *Rodionov I.L., Baru M.B., Ivanov V.T.* // Pept. Res. 1992. V. 5. P. 119–125.
6. *Matsueda G.R., Haber E.* // Anal. Biochem. 1980. V. 104. P. 215–227.
7. *Tam J.P., Kent S.B.H., Wong T.W., Merrifield R.B.* // Synthesis. 1979. V. 12. P. 955–957.
8. *Mitchel A.R., Erickson B.W., Ryabster M.N., Hodges R.S., Merrifield R.B.* // J. Am. Chem. Soc. 1976. V. 98. P. 7357–7362.
9. *Barany G., Merrifield R.B.* // The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology / Eds E. Gross, J. Meienhofer. New York; London; Toronto; Sydney; San Francisco: Acad. Press, 1980. V. 2. P. 3–253.
10. *Stewart J.M., Young J.D.* // Solid Phase Peptide Synthesis. Ed. 2. Rockford (Illinois, USA): Pierce Chem. Co. Publ. 1984. P. 53–124.
11. *Narita M., Honda S., Obana S.* // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1989. V. 62. P. 342–344.
12. *Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I.* // Anal. Biochem. 1970. V. 34. P. 594–598.
13. *Kovács J.* // The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology / Eds E. Gross, J. Meienhofer. New York; London; Toronto; Sydney; San Francisco: Acad. Press, 1980. V. 2. P. 485–539.
14. *Wang S.S., Tam J.P., Wang B.S.H., Merrifield R.B.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1981. V. 18. P. 459–467.
15. *Dimarchi R.D., Tam J.P., Kent S.B.H., Merrifield R.B.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1982. V. 19. P. 88–93.
16. *Brown T., Jones J.H., Richards J.D.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1982. P. 1553–1561.
17. *Blake J., Yamashiro D., Ramasharma K., Choh Hao Li* // Int. J. Pept. Protein Res. 1986. V. 28. P. 468–476.
18. *Yamachiro D., Choh Hao Li* // Int. J. Pept. Protein Res. 1988. V. 31. P. 322–334.
19. *Tam J.P., Merrifield R.B.* // Pept. Res. 1988. V. 1. P. 6–18.
20. *Fujii N., Otaka A., Ikemura O., Natano N., Okamachi A., Funakoshi S., Sakurai M., Shioiri T., Yajima H.* // Chem. Pharm. Bull. 1987. V. 35. P. 3447–3452.
21. *Verdini A.S., Lucietto P., Fossati G., Giordani C.* // Tetrahedron Lett. 1992. V. 33. P. 6541–6542.
22. *Gros C., de Garilhe M.P., Costopanagiotis A., Schwyzler R.* // Helv. Chim. Acta. 1961. V. 44. P. 2042–2048.
23. *Wunsch E., Wendelberger G.* // Chem. Ber. 1967. V. 100. P. 160–172.
24. *Jader G., Geiger R.* // Chem. Ber. 1970. V. 103. P. 1727–1745.
25. *Presentini R., Antoni G.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1986. V. 27. P. 123–126.
26. *Bolin D.R., Sytwu I.-I., Humiec F., Meienhofer J.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1989. V. 33. P. 353–359.
27. *Yajima H., Fujii N., Funakoshi S., Watanabe T., Murayama E., Otaka A.* // Tetrahedron. 1988. V. 44. P. 805–819.
28. *Nomizu M., Inagaki Y., Yamashita T., Ohkubo A., Otaka A., Fujii N., Roller P.P., Yajima H.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1991. V. 137. P. 145–152.
29. *Fujii N., Hayashi Y., Akaji K., Funakoshi S., Shimamura M., Yuguchi S., Lasarus L.H., Yajima H.* // Chem. Pharm. Bull. 1987. V. 35. P. 1266–1269.
30. *Swerdlow M.D., Anderson S.B., Sedgwick R.D., Gabriel M.K., Brambilla R.J., Hindenland D.M., Williams J.I.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1989. V. 33. P. 318–327.
31. *Skiba N.P., Artemyev N.O., Hamm H.E.* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 13210–13216.
32. *Swain A.L., Miller M.M., Green J., Rich D.H., Schneider J., Kent S.B.H., Wlodawer A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 8805–8809.
33. *Tam J.P., Merrifield R.B.* // The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology / Eds S. Udenfriend, J. Meienhofer. San Diego; New York; Berkeley; Boston; London; Sydney; Tokyo; Toronto: Acad. Press Inc., Harcourt Brace Jovanovich Publishers. 1987. V. 9. P. 185–248.
34. *Вольпина О.М., Михалева И.И., Иванов В.Т.* // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. С. 5–49.
35. *Bodanszky M., Martinez J.* // The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology / Eds E. Gross, J. Meienhofer. New York; London; Paris; San Diego; San Francisco; São Paulo; Sydney; Tokyo; Toronto: Acad. Press, 1983. V. 5. P. 111–197.
36. *Mitchell M.A., Runge T.A., Mathews W.R., Ichhpurani A.K., Harn N.K., Dobrowolski P.J., Eckenrode F.M.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1990. V. 36. P. 350–355.
37. *Fink J., Boman A., Boman H.G., Merrifield R.B.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1989. V. 33. P. 412–421.
38. *Maruyama K., Nagata K., Tanaka M., Nagasawa H., Isogai A., Ishizaki H., Suzuki A.* // J. Prot. Chem. 1992. V. 11. P. 1–12.
39. *Lamthanh H., Roumestand C., Deprun C., Menez A.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1993. V. 41. P. 85–95.
40. *Lamthanh H., Virelizier H., Frayssinhes D.* // Pept. Res. 1995. V. 8. P. 316–320.
41. *Brown R.L., Stryer L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 4922–4926.
42. *Niall H.D., Tregear G.W., Jacobs J.* // Chemistry and Biology of Peptides / Ed. J. Meienhofer. Michigan (USA): Ann Arbor Science Publ., 1972. P. 695–699.
43. *Merrifield R.B., Vizidi L.D., Boman H.G.* // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 5020–5031.
44. *Gui-Shen Lu, Mojsov S., Merrifield R.B.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1987. V. 29. P. 545–557.
45. *Kent S.B.H., Alewood D., Alewood P., Baca M., Jones A., Schnölzer M.* // Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis: Peptides, Polypeptides and Oligonucleotides / Ed. R. Epton. Andover: Intercept Ltd., 1992. P. 1–22.
46. *Cintra A.C.O., Oliveira B., Giglio J.R.* // J. Prot. Chem. 1993. V. 12. P. 57–64.

47. Krizek B.A., Amann B.T., Kilfoil V.J., Merkle D.L., Berg J.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. V. 113. P. 4518–4523.
48. Coleman J.E. // *Ann. Rev. Biochem.* 1992. V. 61. P. 897–946.
49. Vallee B.L., Auld D.S. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 5647–5659.
50. Schwabe J.W.R., Klug A. // *Nature Struct. Biol.* 1994. V. 1. P. 345–349.
51. Evans R.M. // *Science.* 1988. V. 240. P. 889–895.
52. Miki Y. // *Science.* 1994. V. 266. P. 66–89.
53. Cho Y., Gorina S., Jeffrey P.D., Pavletich N.P. // *Science.* 1994. V. 265. P. 346–355.
54. Somers W., Ultsch M., De V.A., Kossiakoff A.A. // *Nature.* 1994. V. 372. P. 478–481.
55. Nelbach M., Pigiet J.V.P., Gerhart J.C., Schachman H.K. // *Biochemistry.* 1972. V. 11. P. 315–327.
56. Sunderman F.W., Barber A.M. // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1988. V. 18. P. 267–288.
57. Vallee B.L., Falchuk K.H. // *Physiol. Rev.* 1993. V. 73. P. 79–118.
58. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Пер. с англ. М.: Мир, 1991. С. 342.
59. Gérard D., Lemieux G., Laustriat G. // *Photochem. Photobiol.* 1975. V. 22. P. 89–95.
60. Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. // *Photochem. Photobiol.* 1973. V. 18. P. 263–279.
61. Mély Y., Cornille F., Fournié-Zaluski M.-C., Darlix J.-L., Roques B.P., Gérard D. // *Biopolymers.* 1991. V. 31. P. 899–906.
62. Mély Y., Rocquigny H.D., Morellet N., Roques B.P., Gérard D. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 5175–5182.
63. Cornille F., Mély Y., Ficheux D., Savignol I., Gérard D., Darlix J.-L., Fournié-Zaluski M.-C., Roques B.P. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990. V. 36. P. 551–558.
64. Cheng K.S., Boisvert W., Lerner S.A., Johnston M. // *J. Med. Chem.* 1986. V. 29. P. 2060–2068.
65. Green M., Berman J. // *Tetrahedron Lett.* 1990. V. 31. P. 5851–5852.
66. Ötvös L., Dietzschold B., Kisfaludy L. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1987. V. 30. P. 511–514.
67. Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1964. V. 86. P. 1839–1842.
68. Гершкович А.А., Кубицев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наук. думка, 1992.
69. Arai I., Muramatsu I. // *J. Org. Chem.* 1983. V. 48. P. 121–122.
70. Fukase K., Kitazana M., Wakamiya T., Shiba T. // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1990. V. 63. P. 1838–1840.
71. Lyle T.A., Brady S.F., Ciccarone T.M., Colton C.D., Peleda W.J., Veber D.F., Nutt R.F. // *J. Org. Chem.* 1987. V. 52. P. 3752–3759.
72. Gisin B.F. // *Anal. Chim. Acta.* 1972. V. 58. P. 248–249.

## The Total Solid Phase Synthesis of the $\gamma$ Subunit of cGMP Phosphodiesterase from Bovine Retina and Some Physicochemical Properties of the Synthetic Protein

L. N. Rodionova\*, V. E. Zagranichny\*, I. L. Rodionov\*, V. M. Lipkin\*\*, and V. T. Ivanov\*\*

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

\*\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

The 87-membered polypeptide with the sequence of the  $\gamma$  subunit of cGMP phosphodiesterase from bovine retina rods (PDE $\gamma$ ) was synthesized by the solid phase method. Two synthetic approaches, which were based on the Boc/Bzl-strategy, were used; both syntheses were carried out in a continuous-flow reactor with swellographic monitoring. In the first approach, five Arg residues were coupled in the form of Boc-Arg(Z)<sub>2</sub>-OH and the final cleavage of the peptide from the support was effected by the mixture of CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>SiMe<sub>3</sub> and thioanisole in trifluoroacetic acid. There resulted a heterogeneous, ornitine-rich, and absolutely inactive peptide material which was insoluble in aqueous alkali. In the second approach, Arg(Tos) and the HF low-high cleavage procedure were used, which resulted in a homogeneous polypeptide (according to HPLC and capillary electrophoresis) that manifested correct molecular mass under ion-spray mass spectrometry and the full functional activity characteristic of the native protein. The effect of zinc salts on the PDE $\gamma$  fluorescence in solutions and on its solubility was established. This demonstrated a significant PDE $\gamma$  affinity with Zn<sup>2+</sup> ions and appeared to be connected with the functioning of the protein in the retina cells. For the first time, the dynamics of the peptidylpolymer swelling in different solvents was studied during the synthesis of peptides with very long sequences.

*Key words:* cGMP phosphodiesterase,  $\gamma$  subunit; solid phase peptide synthesis; zinc fingers; peptidylpolymer, swelling; swellographic monitoring