



УДК 547.963.4.07

СИНТЕЗ ГЛУТАМИЛСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 61 — 77 ЦИТОХРОМА *c* СЕРДЦА ЛОШАДИ

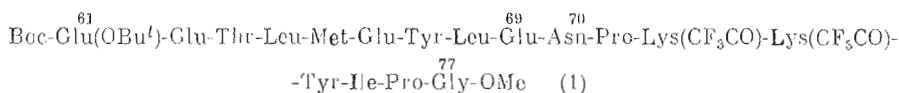
*Вольская Н. Е., Васильева Г. А., Миронов А. Ф.,
Евстигнеева Р. П.*

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Предложен способ получения глутамилсодержащих пептидов с незащищенной γ -карбоксильной группой. Он заключается в использовании пивалоилхлорида в качестве конденсирующего агента при синтезе соединений, содержащих глутаминовую кислоту как в последовательности, так и С-концевую. Метод продемонстрирован на примере получения пептидов, отвечающих участку 61—77 белковой цепи цитохрома *c* сердца лошади.

Цитохром *c* — гемопроteid терминального участка цепи окислительного фосфорилирования. Синтез пептидов, отвечающих последовательности его фрагментов, является составной частью исследований по созданию гемпептидных комплексов белка. Он имеет также и большое самостоятельное значение для разработки методологии получения пептидных веществ большого молекулярного веса.

Настоящее сообщение посвящено синтезу 17-членного пептида (1), отвечающего последовательности 61—77 полипептидной цепи цитохрома *c*

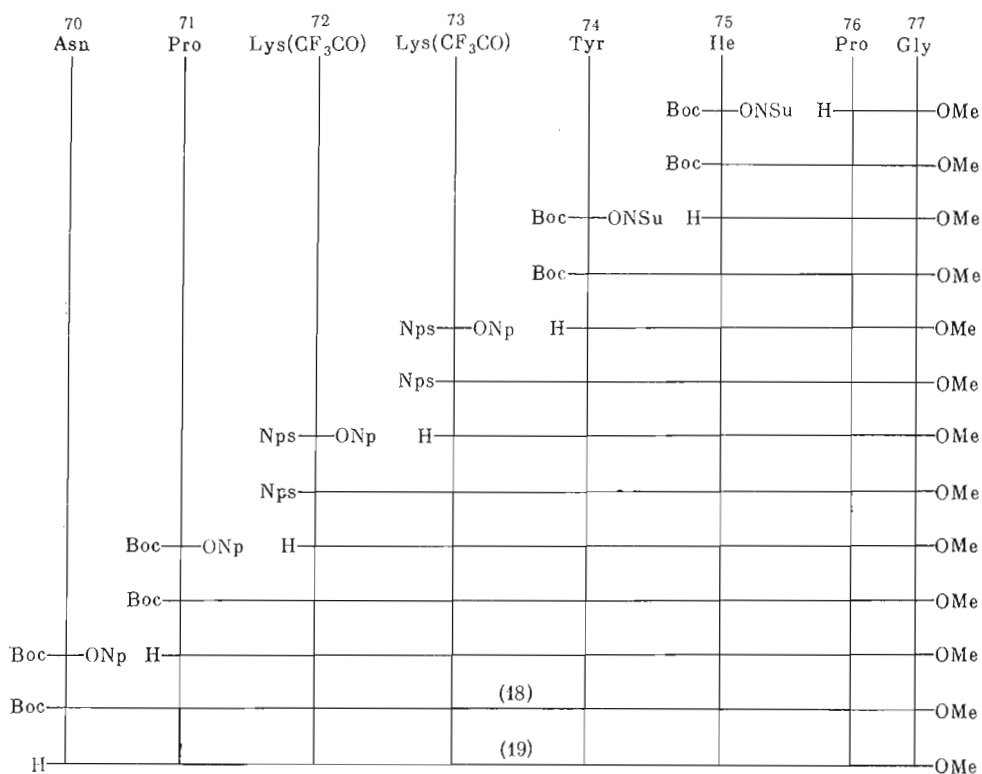


Этот фрагмент включает четыре из девяти имеющихся в белке остатков глутаминовой кислоты, а также важный в функциональном отношении тирозин-67. Нонапептид (61—69) непосредственно предшествует участку (70—80), наиболее значительному неизменному сегменту полипептидной цепи цитохромов *c* различной видовой специфичности. Абсолютная инвариантность области (70—80), вероятно, отражает важность данной последовательности для образования специфической структуры цитохрома *c*. Показано, что синтетический ундекапептид (70—80) ингибирует цитохром-оксидазное окисление ферроцитохрома *c* [1].

Синтез гептадекапептида проводили классическими методами в растворе с использованием минимума защит для трифункциональных аминокислот. В соответствии с этим постоянной защитой блокировалась только ϵ -аминофункция лизина (трифторацетильной группировкой), а образование пептидной связи осуществляли методом активированных эфиров. Конденсацию фрагментов (61—62), (63—66), (67—69), (63—69), (61—69), (70—

Сокращения: ONp — *n*-нитрофенокси-, Nps — *o*-нитрофенилтио-

Схема 2



77) планировали проводить азидным методом. При этом становилась возможной работа с незащищенными по боковым функциональным группам треонином и глутаминовой кислотой, а также частично снималась проблема растворимости. Известно, что пептиды средней длины с незащищенной γ -карбоксовой группой глутаминовой кислоты имеют большую растворимость по сравнению с замещенными производными [2].

Учитывая особенности первичной структуры данного фермента цитохрома *c*, а также выбранную стратегию синтеза, мы считали интересным опробовать для проведения конденсации пептидов, содержащих остаток глутаминовой кислоты с незащищенной γ -карбоксовой группой, подход, предложенный ранее для синтеза гемпептидных комплексов цитохрома *c*. Он заключается в наращивании аминокислотной цепи гемпептидов с С-конца методом смешанных ангидридов без защиты пропионовых групп гема. Для образования смешанного ангидрида использовался пивалоилхлорид [3].

Синтез нонапептида (61—69) осуществляли фрагментной конденсацией пептидов (схема 1), причем С-концевой аминокислотой во всех случаях была этерифицированная метиловым спиртом *L*-глутаминовая кислота. Ди-, три-, тетрапептиды и октапептид, соответствующий участку (70—77) [4] (схема 2), синтезированы методом ступенчатого удлинения цепи с С-конца.

α -Аминогруппа аминокислот блокировалась *Boc*- или *Nps*-группировками. Последняя оказалась оптимальной для защиты α -аминогруппы метионина, так как при удалении *Boc*-группировки с метионинсодержащего дипептида (6) 3 н. раствором хлористого водорода в метаноле в течение 30 мин наблюдалось образование побочных веществ.

Аминолиз активированных эфиров проводили в хлороформе в присутствии 3 экв. ледяной уксусной кислоты. При получении метионинсодержащего дипептида (6) реакцию осуществляли в присутствии 3 экв. триметилуксус-

ной кислоты. Синтез тетрапептида (10) осуществляли в смеси этилацетат — ДМФА (3 : 1) с 2 экв. 1-оксибензотриазола. Далее соответствующие производные либо омыляли 1 н. NaOH в метаноле в течение 1 ч при 50°, либо переводили в гидразиды.

Образование смешанного ангидрида пептидов с пивалоилхлоридом происходило в хлороформе в присутствии пиридина и триэтиламина. Пептиды, отвечающие участкам (61—69) и (61—77), получены на этой стадии с выходами 75 и 67% соответственно [4]. В дальнейшем при отработке этой методики на больших количествах выход 17-членного пептида (1) удалось увеличить до 81%.

Для проверки стереоспецифичности образования α -амидной связи с участием пивалоилхлорида нами осуществлен синтез пептидов (16,1) методом окисления гидразидов иодом в пиридине [5] (наиболее надежные результаты с точки зрения оптической чистоты [6]). Реакции сочетания проводили в этилацетате в присутствии триэтиламина в течение 1—1,5 ч. Совпадение физико-химических характеристик для пептидов, синтезированных по обоим методикам, позволяет говорить о высокой степени оптической чистоты пептидов, полученных с помощью пивалоилхлорида.

Использование этого реагента при получении пептидов, содержащих остаток глутаминовой кислоты с незащищенной γ -карбоксильной группой, позволяет существенно упростить процесс синтеза, так как предусматривает применение доступных производных глутаминовой кислоты и сокращение общего числа стадий при проведении синтеза. Применение пивалоилхлорида расширяет арсенал конденсирующих агентов для получения пептидов с минимальной защитой трифункциональных аминокислот.

Экспериментальная часть

Индивидуальность полученных соединений контролировалась с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем Silufol в системах: циклогексан — хлороформ — уксусная кислота, 45 : 45 : 10 (А); хлороформ — метанол — ацетон, 8 : 1 : 1 (Б); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 13 : 2 : 5 (В); пропанол — вода, 7 : 3 (Г); этилацетат — метанол, 8 : 2 (Д). Обнаружение проводили нингидрином. Определение N-концевых аминокислот осуществляли дансильным методом [7]. Данные элементного и аминокислотного анализов синтезированных пептидов соответствовали вычисленному содержанию С, Н, N и соотношениям аминокислот. Удельное вращение определяли при 20—25° на цифровом спектрофотометре Perkin-Elmer 241-МС (Швеция), длина кюветы 1 дм. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе ВС-200 (ФРГ). В работе использованы аминокислоты, производимые фирмой Reanal (ВНР).

Синтез пептидов последовательным наращиванием цепи методом активированных эфиров. Типовая методика. К 5 ммоль хлоргидрата метилового эфира аминокислоты (пептида) в сухом хлороформе добавляли 15 ммоль N-метилморфолина, 5 ммоль активированного эфира N-замещенной аминокислоты и 15 ммоль ледяной уксусной кислоты. Через 24—48 ч перемешивания при 20° растворитель упаривали. Остаток растворяли в этилацетате и промывали последовательно водой, 0,1 н. H₂SO₄, водой — при получении пептидов, содержащих остаток глутаминовой кислоты (схема 1). Во всех остальных случаях этилацетатный раствор пептидов промывали также 5% NaHCO₃. После высушивания растворов над MgSO₄ этилацетат упаривали при температуре не выше 45°. При выделении метионинсодержащих ди- и трипептидов упаривание проводили при 20°. Пептиды, содержащие остаток глутаминовой кислоты, как правило, кристаллизировали из смеси эфир — гексан. Пептиды, отвечающие последовательности 70—77, представляли собой низкоплавкие аморфные вещества, и при получении октапептида в препаративном количестве процесс проводили без выделения промежуточных соединений.

Соединение	Выход, %	Т. пл., °C	R _f в системе		[α] _D ²⁰ (с 1,0, мета- пол)	Брутто-формула (по результатам элементного анализа)
			А	Б		
Nps-Leu-Glu-OMe (2)	51 *	99-101	0,59	0,84	+14,0	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₇
Nps-Tyr-Leu-Glu-OMe (4)	70	67-69	0,20	0,47	+12,0	C ₂₇ H ₃₁ N ₄ O ₈ S
Nps-Met-Glu-OMe (6)	73	134-136	0,39	0,63	-25,0	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₇ S ₂
Nps-Leu-Met-Glu-OMe (8)	76	108-109	0,42	0,80	-14,9	C ₂₇ H ₃₁ N ₄ O ₈ S ₂
Nps-Thr-Leu-Met-Glu-OMe (10)	98	116-119	0,31	0,56	-2,2 ^{2*}	C ₂₇ H ₄₁ N ₄ O ₁₀ S ₂
Вос-Glu(OBu ⁴)-Glu-NHNH ₂ (15)	94,5	145-147	0,19	0,70 ^{4*}	-24,0	C ₁₉ H ₃₄ N ₄ O ₈ ·H ₆ N ₂ O
Вос-Asn-Pro-Lys(CF ₃ CO)- -Lys(CF ₃ CO)-Tyr-Ile-Pro- -Gly-OMe (18)	14,1 ^{3*}	184-188	0,78 ^{4*}	0,52	-4,0	Gly 1,00; Asp 0,82; Pro 1,69; Lys 2,07; Tyr 1,18; Ile 1,01

* Выход указан после дополнительной очистки вещества на колонке с силикагелем И 40/100 мкм, элюент система хлороформ — ацетон, 8:2.

^{2*} Растворитель ДМФА.

^{3*} Выход защищенного октапептида приведен в расчете на исходный HCl-Gly-OMe.

^{4*} Система для хроматографии В.

Nps-Thr-Leu-Met-Glu-OMe (10). К раствору 0,42 г (0,95 ммоль) хлоргидрата трипептида (9) (получен при обработке 0,6 г эфира (8) 3,5 н. раствором хлористого водорода в метаноле) в 3 мл ДМФА добавляли 0,36 мл (2,85 ммоль) N-метилморфолина, раствор 0,29 г (0,95 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира о-нитрофенилсульфенил-L-треонина в 9 мл этилацетата и 0,37 г (1,9 ммоль) 1-оксисбензотриазола. Спустя 48 ч раствор разбавляли этилацетатом, промывали водой, 0,1 н. H₂SO₄, снова водой. После высушивания над MgSO₄ растворитель упаривали. Вещество кристаллизовалось при добавлении эфира (см. таблицу).

Вос-Glu(OBu⁴)-Glu-N₂H₃ (15) получали из 0,37 г (0,81 ммоль) метилового эфира дипептида (14) (неустойчивого маслообразного вещества, синтез которого осуществляли методом активированных эфиров по типовой методике) при обработке его 25-кратным избытком гидразингидрата в течение 12 ч при 20°. После отгонки растворителя гидразид пептида (15) выделяли добавлением воды. Выход 0,35 г (94,5%), т. пл. 145-147° (хлороформ — метанол); R_f 0,19 (А), 0,70 (В); [α]_D²⁰ -24° (MeOH). C₁₉H₃₄N₄O₈·H₆N₂O.

Вос-Glu(OBu⁴)-Glu-Thr-Leu-Met-Glu-Tyr-Leu-Glu-OMe (16). 0,16 г (0,37 ммоль) кислоты (15) после омыления дипептида (14) растворяли в сухом хлороформе, добавляли 0,06 мл (0,74 ммоль) пиридина и 0,042 мл (0,37 ммоль) триэтиламина. При 0° прибавляли 0,045 мл (0,37 ммоль) пивалоилхлорида и спустя 15-20 мин — 0,32 г (0,37 ммоль) гептапептида (13). Реакция продолжалась 1 ч при 20°. Растворитель упаривали, пептид выделяли добавлением этилацетата. Вещество перекристаллизовывали из смеси ацетон — этилацетат. Выход 0,37 г (75%), т. пл. 184-185°, R_f 0,40 (В), 0,64 (Г); [α]_D²⁰ +15,2° (MeOH). Аминокислотный состав: Met 1,00, Tyr 0,80, Leu 1,70, Glu 3,90, Thr 0,55.

Вос-Glu(OBu⁴)-Glu-Thr-Leu-Met-Glu-Tyr-Leu-Glu-Asn-Pro-Lys(CF₃CO)-Lys(CF₃CO)-Tyr-Ile-Pro-Gly-OMe (1) синтезировали аналогично из 0,37 г кислоты (17) и 0,28 г октапептида (19) в количестве 0,51 г (81%), т. пл. 194-196° (хлороформ — метанол), R_f 0,14 (В), 0,56 (Г); [α]_D²⁰ +7,2° (50% MeOH). Аминокислотный состав: Gly 1,00, Ile 0,99, Lys 1,99, Pro 2,40, Met 0,93, Thr 1,42, Leu 1,91, Tyr 2,00, Asp 0,72, Glu 4,03.

Nps-Thr-Leu-Met-Glu-Tyr-Leu-Glu-OMe (12). К раствору 0,312 г (0,48 ммоль) гидразида (11) (см. методику для (15)) в этилацетате прибавляли 0,220 г (0,48 ммоль) хлоргидрата (5), охлаждали до 0°. Затем добавляли 0,12 мл (2,5 ммоль) триэтиламина и 0,15 мл (2,5 ммоль) раствора I₂ в пи-

ридине. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°. Растворитель упаривали, вещество осаждали эфиром и очищали на колонке с сефадексом LH-20. Пептид (12) элюировали хлороформом и перекристаллизовывали из смеси хлороформ — этилацетат. Выход 0,359 г (71,4%), т. пл. 162—165°, R_f 0,20 (В), 0,50 (Д); $[\alpha]_D^{21} +1,4^\circ$ (MeOH). Аминокислотный состав: Met 1,00, Leu 1,89, Glu 1,92, Tyr 0,85, Thr 0,61.

Нонапептид (16) получен по приведенной выше методике из 0,096 г гидразида пептида (15) и 0,200 г гептапептида (13) с выходом 64,8%. Т, пл. 183—185°, R_f 0,40 (В), 0,64 (Г); $[\alpha]_D^{20} +15,8^\circ$ (MeOH).

Гептадеканептид (1) получали аналогично из 0,200 г гидразида нонапептида (17) и 0,146 г октапептида (19) с выходом 56%, т. пл. 194—196°, R_f 0,14 (В), 0,56 (Г); $[\alpha]_D^{20} +6,9^\circ$ (50% MeOH).

ЛИТЕРАТУРА

1. Wolman Y., Shejner A., Sokolovsky M. (1972) J. Amer. Chem. Soc., **94**, 1720—1723.
2. Borin G., Moroder L., Marchiori F., Scoffone E. (1973) Biopolymers, **12**, 693—700.
3. Евстигнеева Р. П., Миронов А. Ф., Васильева Г. А., Сидорова Т. А. (1976) Авт. свид. № 521280 от 26.03.75 г. Опул. в Бюл. № 26 от 15.07.76 г.
4. Васильева Г. А., Вольская Н. Е., Миронов А. Ф., Евстигнеева Р. П. Положит. решение от 22.02.78 г. по заявке № 2479306/23—04 от 25.04.77 г.
5. Wolman Y., Gallor P. M., Patchornik A., Berger A. (1962) J. Amer. Chem. Soc., **84**, 1889—1892.
6. Przylylski J., Jeschkeit H., Kupryszewsky G. (1977) Roczn. Chem., **51**, 939—949.
7. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) Biochem. J., **89**, 59p.

Поступила в редакцию
7.VII.1978
После доработки
30.VIII.1978

SYNTHESIS OF GLUTAMYL CONTAINING PEPTIDE FRAGMENTS OF HORSE HEART CYTOCHROME *c* SEQUENCE 61--77

VOL'SKAYA N. E., VASILIEVA G. A., MIRONOV A. F., EVSTIGNEEVA R. P.}

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

A method has been proposed for preparing glutamyl containing peptides bearing unprotected γ -carboxyl group. This method relies upon pivaloyl chloride as a condensing reagent in the synthesis of peptides with glutamic acid residues at C-terminus or within the amino acid sequence. The possibilities of the proposed procedure are exemplified with the preparation of peptides corresponding to the 61-77 segment of the horse heart cytochrome *c* amino acid sequence.