



УДК 547.962.07

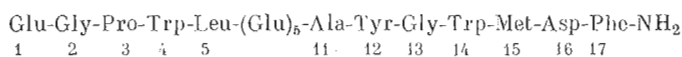
СИНТЕЗ КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ ГАСТРИНА И ИХ КОНЬЮГАЦИЯ С БЕЛКАМИ

Ирусиков А. Н., Самарцев М. А., Мартынов В. Ф.

Ленинградский государственный университет им. А. А. Жданова

Синтезированы пептиды последовательности 1-6, 10-17, 14-17 гастринна, а также их аналоги: [Gly⁶]гастрин 1-6, [Lys⁷-ОМе]гастрин 1-7, [Lys¹², βAla¹³]гастрин 12-17, [Orn¹⁵]гастрин 14-17. Физиологические испытания синтезированных пептидов показали, что введение дополнительной ионогенной группы в активную часть гормона уменьшает кислотность секрета. Ни один из испытанных пептидов не ингибировал секреции, стимулированной пентагастрином. Проведена конъюгация фрагментов гастринна с человеческим сывороточным альбумином и овальбумином с помощью толуиленадиизоцианата, динитродифторбензола, водорастворимого карбодимида. Дана сравнительная характеристика этих методов.

В 1964 г. Грегори и Трейси выделили гормон желудочно-кишечного тракта, гастрин, и установили его структуру [1]:



В настоящее время известно несколько форм этого гормона. Это в первую очередь гептадекапептид, синтезированный впервые в 1964 г. [2], «гастрин-I», и «гастрин-II» — его аналог, сульфатированный по гидроксильной группе тирозина-12, а также «биг»-гастрин — пептид, состоящий из 34 аминокислотных остатков и сохраняющий последовательность 2-17 гептадекапептида. Кроме того, обнаружены так называемые «мини»-гастрины, состав которых отвечает С-концевому тридекапептиду, и «биг-биг»-гастрин — вещество с мол. весом ~22000, факт существования которого окончательно не установлен.

Физиологическое действие гастринна заключается в стимулировании почти всех функций желудочно-кишечного тракта: секреции, моторики, всасывания. Под его влиянием происходит увеличение секреции воды, электролитов, ферментов слизистой желудка и поджелудочной железы. Амид С-концевого тетрапептида, являющийся общим для всех форм гастринна, обладает полным спектром физиологического действия, хотя и более слабым, чем у целой молекулы.

Морли с сотрудниками синтезировали более 600 аналогов С-концевого тетрапептида гастринна [3] и исследовали их физиологическое действие. Несколько более активными, чем природный тетрапептид, оказались некоторые его N-ацилированные производные, одно из которых, названное

Использованы сокращения: -ONp — *n*-нитрофенокси-, -OPсr, -OTсr — соответственно пента- и тетрахлорфенокси-, -ONSu — сукцинимидоокси-.

Биологическое действие синтезированных пептидов

Обозначение	Пептид	Среднее количество кислоты в секрете	
		мюэк *	в % от кислотности, вызванной пентагастрином
(I)	Вос-βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	1,50	100
(Ia)	+H ₂ -βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ ·Cl ⁻	0,55	36
(II)	Вос-βAla-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	1,62	108
(III)	+H ₂ -Lys(+H ₂)-βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ ·2Cl ⁻	0,21	15
(IV)	Z-Trp-Orn(+H ₂)-Asp-Phe-NH ₂ ·Cl ⁻	0	0
(V)	<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Lys-OMe	—	—
(VI)	<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-OH	0	0
(VII)	<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Gly-OH	—	—

* Кислотность желудочного сока, вызванная действием фрагментов гастринина и их аналогов.

пентагастрином, Вос-βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, принято как стандартный заменитель натурального гастринина.

Развитие радиоиммуноанализа сделало возможным изучение вопроса о специфичности антител к различным формам гастринина. Было установлено, что вырабатываемые к гептадекапептиду антитела специфичны к С-концевой части молекулы вне зависимости от того, является ли иммунизирующим агентом свободный гормон или его фрагмент последовательности 2—17, конъюгированный с белком [4]. Эти антитела реагируют, хотя и в небольшой степени, с «мини»-гастрином и с холецистокинином — гормоном желудочно-кишечного тракта, имеющим общий с гастрином С-терминальный пентапептид. Значительная специфичность антигастриновых антител к «биг»-гастрину не позволяет разделять эти формы гормона в одной системе радиоиммуноанализа.

Задачей настоящей работы был синтез пептидов, отвечающих С- и N-концевой аминокислотной последовательности гастринина, а также их аналогов, и конъюгаты полученных соединений с белками. Создание таких конъюгированных антигенов позволило бы путем иммунизации животных получать антитела к конкретным участкам молекулы и изучать их иммуноспецифичность по отношению к различным формам и фрагментам гастринина. Кроме того, конъюгаты фрагментов гастринина с альбуминами могут служить ценным инструментом для изучения новых аспектов иммунохимии и физиологии гастринина. Так, они позволили нам обнаружить аутоантитела к гастрину в крови людей и животных [5]. Являясь новой макромолекулярной формой гастринина с высокой плотностью физиологически активного фрагмента, конъюгаты обладают отличным от самого гормона действием на секрецию [6].

Синтезированные нами для получения конъюгатов и изучения специфичности антисывороток пептиды представлены в табл. 1.

Путь синтеза нонанептида (II), включающего С-концевой октапептид, показан на схеме 1. Для получения пептидов (I), (II), (IV), фрагментов (VIII), (X) использовали метод последовательного наращивания цепи с помощью активированных эфиров. Синтез пептида (XI) осуществляли фрагментарной конденсацией по схеме 4+4, без выделения промежуточного оксисулфинимидного эфира фрагмента (X).

Получение пептида (V) представлено на схеме 2. Фрагменты (XII) и (XVI) синтезировали последовательной конденсацией активированными эфирами, затем проводили сшивку фрагментов по схеме 3+4 при помощи дидиклогексилкарбодимида в присутствии оксисулфинимида. Аналогично при синтезе гексапептидов (VI) и (VII) была использована схема 3+3.

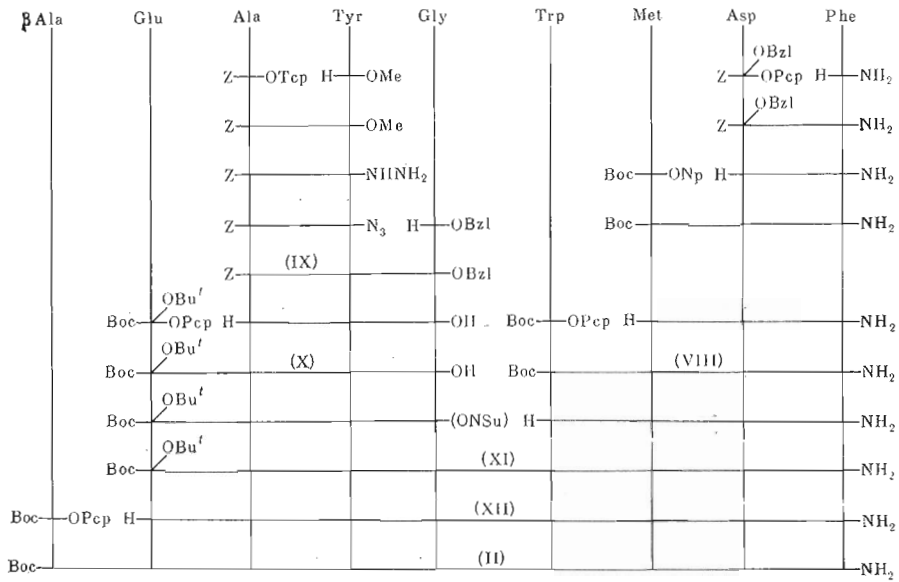
Таблица 2

Аминокислотный состав конъюгатов человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и овальбумина (ОА) с фрагментами гастрина, полученных при использовании различных реагентов для конъюгации

Аминокислота	ЧСА *	Реагент										ОА *	Реагент		
		динитрофторбензол					толуилдендизоцианат						толуилдендизоцианат	карбодиймид	
		белок + пептид											белок + пептид		
		ЧСА+(I)	ЧСА+(II)	ЧСА+(V)	ЧСА+(I)	ЧСА+(II)	ЧСА+(V)	ЧСА+(I)	ЧСА+(II)	ЧСА+(V)	ЧСА+(VII)		ОА+(I)	ОА+(II)	ОА+(VII)
Asp	51,3(52)	81,3	51,6	70,7	72,1	51,3	51,5	32,3(32)	42,8	38,2	32,3	32,3	38,2	32,3	
Thr	28,7(28)	28,4	28,3	28,3	28,3	28,7	29,0	15,7(16)	15,8	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	
Ser	21,9(24)	21,7	21,5	24,8	21,5	22,0	23,0	43,0(43)	41,9	43,7	43,3	43,3	43,7	43,3	
Glu	81,8(81)	113,8	98,3	80,7	110,1	141,4	101,3	52,5(52)	52,5	57,2	55,9	55,9	57,2	55,9	
Pro	22,0(25)	21,2	28,1	21,6	21,5	49,3	42,0	17,6(16)	17,5	17,7	23,0	23,0	17,7	23,0	
Gly	12,0(12)	11,8	18,1	14,0	37,7	40,2	44,4	19,3(19)	19,3	25,3	29,4	29,4	25,3	29,4	
Ala	60,9(62)	91,6	61,0	59,7	79,1	60,6	61,7	30,7(28)	29,8	28,1	28,0	28,0	28,1	28,0	
Val	39,9(41)	39,8	39,8	39,4	39,9	39,6	39,4	27,9(28)	27,7	35,0	31,7	31,7	35,0	31,7	
Met	3,6(6)	32,8	3,6	19,6	22,3	33,1	3,5	14,0(16)	21,1	17,1	13,8	13,8	17,1	13,8	
Ile	7,4(8)	7,7	6,1	7,3	7,3	7,5	9,9	26,0(26)	26,5	26,4	25,1	25,1	26,4	25,1	
Leu	61,0(60)	61,4	68,3	61,4	60,9	89,4	78,6	32,7(33)	32,8	32,7	36,4	36,4	32,7	36,4	
Tyr	14,0(17)	44,2	14,0	14,0	37,9	15,2	17,0	10,3(10)	10,5	14,1	10,2	10,2	14,1	10,2	
Phe	31,8(33)	60,7	33,1	51,6	54,1	31,3	33,3	21,1(21)	31,5	26,8	21,1	21,1	26,8	21,1	
His	15,3(15)	16,3	14,8	15,7	18,0	16,9	33,3								
Lys	53,1(56)	52,5	62,3	53,9	54,7	85,0	54,7								
Arg	23,5(23)	23,4	22,7	23,5	23,5	23,8	23,5								
Степень конъюгации	2,0±0,5	30,4±1,0	7,4±1,0	18,3±1,6	22,5±2,9	29,1±1,4	18,3±1,4		9,3±1,5	4,8±1,1	4,4±0,8	4,4±0,8	4,8±1,1	4,4±0,8	

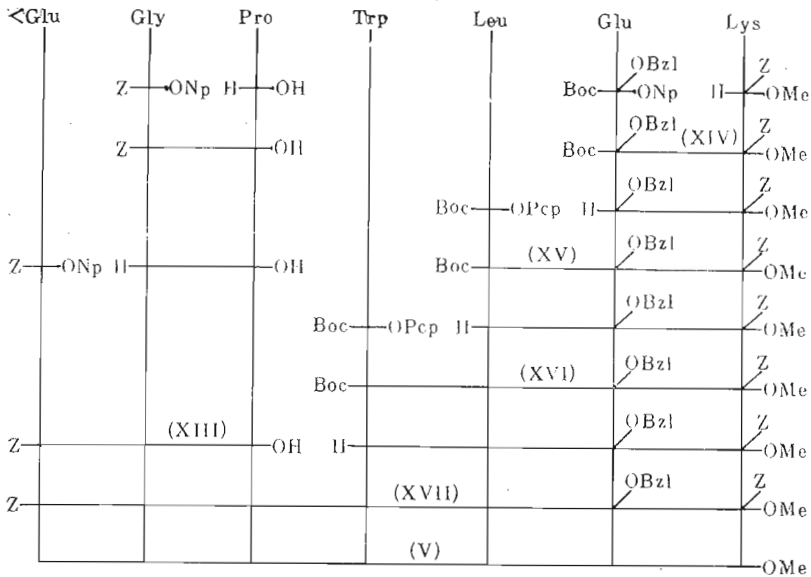
* В скобках приведены литературные данные по аминокислотному составу ЧСА [16] и ОА [17].

Схема 1



Синтез nonaпептида (II), включающего C-концевую последовательность 10–17 гастрина

Схема 2



Синтез N-концевого фрагмента последовательности [Lys-⁷OMe]гастрин 1–7

Удаление защитных карбобензокси групп и бензиловых эфиров на всех стадиях синтеза проводили каталитическим гидрированием. *Трет*-бутил-оксикарбонильную группу и *трет*-бутиловые эфиры удаляли действием трифторуксусной кислоты в хлористом метиле (1 : 2). В случае метионин- и триптофансодержащих пептидов те же группы удаляли действием 1 н. HCl в ледяной уксусной кислоте в присутствии меркаптоэтанола. Известно, что HCl в уксусной кислоте является единственным реагентом, исключаящим опасность *трет*-бутирования триптофана при деблокиро-

вани [7], а присутствие меркаптана предотвращает его окисление [8]. Меркаптоэтанол использовали также и для восстановления окисленных производных метионина [9]. Отсутствие побочных продуктов при снятии защитных групп в наших условиях подтверждено получением хроматографически и электрофоретически индивидуальных хлоридратов пептидов.

Синтезированные таким образом гастриновые пептиды испытывались на физиологическую активность*: собакам с павловским желудочком внутримышечно вводили раствор испытуемого пептида из расчета 10 нмоль на 1 кг веса, измеряли объем секрета каждые 15 мин в течение 2 ч и определяли общее количество кислоты в секрете. Результаты испытаний представлены в табл. 1. Полученные данные согласуются с предположением Морли [3] о том, что при увеличении полярности и объема бокового радикала аминокислоты в положении 15 гастрина (пептид (IV)) или вблизи него, как у пептидов (Ia) и (III), активность соответствующих аналогов заметно падает. Хотя в литературе имеются указания на то, что аналоги С-концевого пептида гастрина, содержащие поногенную группировку в непосредственной близости от остатка аспарагиновой кислоты, могут обладать ингибиторными свойствами [10, 11], мы не обнаружили снижения уровня кислотности секрета, продуцируемого при действии пентагастрина (10 нмоль/кг), после введения пептидов (Ia), (III), (IV) в дозах от 50 до 100 нмоль/кг.

Известные в настоящее время методы присоединения пептидов к белкам с помощью различных бифункциональных реагентов или водорастворимых карбодимидов часто осложняются протеканием побочных реакций сшивки между молекулами белка, что приводит к получению плохо растворимых продуктов и понижает степень конъюгации. Нами были использованы три метода: диизоцианатный [12], карбодимидный [13] и с применением 2,4-динитро-1,5-дифторбензола [14]. Результаты аминокислотного анализа полученных конъюгатов представлены в табл. 2. Возможность использования полученных препаратов определялась, во-первых, достаточной степенью конъюгации (не менее 10 остатков пептида на молекулу альбумина) и, во-вторых, достаточной растворимостью их в воде или водном буфере, что позволяло бы без потерь очистить конъюгат от непрореагировавшего пептида и неорганических солей. Конъюгаты, полученные при помощи карбодимида, не удовлетворяли этим требованиям и не могли использоваться как иммунизирующие агенты.

Применявшиеся нами методы конъюгации с помощью толуилеандиизоцианата и динитродифторбензола имеют принципиальное различие. В первом происходит активация альбумина избытком бифункционального реагента — толуилеандиизоцианата, во втором активируется аминогруппа пептида. Применение диизоцианатного способа дает стабильную высокую степень конъюгации для различных пептидов, но требует довольно большого объема реакционной смеси для предотвращения межмолекулярных реакций и тем не менее приводит к частичной сшивке альбумина и пониженной растворимости конъюгата. Активация пептида большим избытком динитродифторбензола с последующим добавлением белка позволяет вести реакцию в небольшом объеме и приводит к хорошо растворимым продуктам, но степень конъюгации в ряде случаев получается низкой. Препараты, наиболее перспективные для иммунизации и физиологических исследований, получены при конъюгации пептидов (I), (II) и (V) с сывороточным альбумином и пептида (I) с овальбумином диизоцианатным методом, а также при реакции с сывороточным альбумином пептидов (II) и (V), активированных динитродифторбензолом.

* Физиологическую активность определяли в Институте физиологии им. И. П. Павлова АН СССР в лаборатории физиологии пищеварения (зав. лабораторией — П. К. Климов).

Экспериментальная часть

В работе использовали овальбумин (Олайнский завод химреактивов), сывороточный альбумин человека, $\text{Woc-Glu}(\text{OBu}^{\prime})\text{-OH}$ и $\text{Woc-Glu}(\text{OBzl})\text{-OH}$ (Reanal, Венгрия). Остальные производные аминокислот были получены из аминокислот L -ряда по описанным методикам. Их характеристики отвечали литературным. Активированные эфиры получали карбодимидным методом, тозилаты бензиловых эфиров аминокислот — азеотропной этерификацией в присутствии бензола [15]. Данные элементного и аминокислотного анализов синтезированных пептидов соответствовали вычисленному содержанию C, H, N и соотношениям аминокислот. Аминокислотный состав определяли на приборе Biotronic LC-6000 (ФРГ), удельное вращение — на поляриметре Windel Zeiss. Температуры плавления не исправлены.

Контроль за чистотой и индивидуальностью полученных соединений проводили с помощью ТСХ на пластинках с незакрепленным слоем силикагеля L5/40 μ (Сhemapol, СССР) в системах: n -пропанол — 1% NH_4OH , 3:1 (А); хлороформ — метанол, 9:4 (Б); n -бутанол — уксусная кислота — толуол — вода, 6:1:1:2 (В), бензол — тетрагидрофуран, 5:2 (Г); бензол — тетрагидрофуран, 1:1 (Д); этилацетат — n -бутанол — уксусная кислота — вода, 1:1:1:1 (Е), этилацетат — гексан, 2:1 (Ж).

Электрофорез на бумаге проводили в вертикальной камере ОЕ-205 (Labog, Венгрия) при напряжении 1400 В в течение 60 мин в 2% уксусной кислоте. Обнаружение пятен осуществляли хлором и бензидином, реактивом Эрлиха или реактивом Паули. E_{Gly} — электрофоретическая подвижность по глицину, E_{Tyr} — подвижность по триптофану при проявлении реактивом Эрлиха, E_{Tyr} — подвижность по тирозину при проявлении реактивом Паули. Гидролиз пептидов проводили по методике [18] в 4 н. метансульфокислоте, конъюгатов — в 6 н. HCl , содержащей 0,1% фенола, при 110° в течение 24 ч.

Стандартные процедуры обработки пептидов. Защищенные пептиды, растворимые в этилацетате, промывали 5% NaHCO_3 , водой, 1 н. H_2SO_4 , сушили Na_2SO_4 . Если пептид имел свободную карбоксильную группу, промывка NaHCO_3 исключалась. Если защищенный пептид осаждался из реакционной смеси водой и не растворялся в этилацетате, аналогичные промывки производили с осадком на фильтре.

Удаление карбобензоксигруппы и бензиловых эфиров проводили каталитическим гидрированием на палладии, осажденном на угле, за полной протекания реакции следили с помощью электрофореза или ТСХ. Для удаления *tert*-бутилоксикарбонильной защиты растворяли защищенный пептид в хлористом метиле и добавляли трифторуксусную кислоту до достижения 30% концентрации; через 15–20 мин раствор упаривали и остаток сушили в вакууме над KOH . В случае триптофансодержащих пептидов для удаления Woc -защиты пептид растворяли в ледяной AsOH , добавляли несколько капель меркаптоэтанола и смешивали с равным объемом 2 н. HCl в AsOH ; через 45–50 мин раствор упаривали, остаток растворяли в небольшом объеме метанола и осаждали хлоргидрат пептида эфиром. Упаривание растворителей проводили на роторном испарителе в вакууме при температуре до 40°.

Woc-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (I). Из 4,8 г тетрапептида $\text{Woc-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$ (VIII) [19] действием HCl/AsOH получено 4,31 г (98%) соответствующего хлоргидрата с R_f 0,5 (А); R_f 0,44 (Б); E_{Gly} 0,85; E_{Trp} 1,34. Растворяли 1,266 г этого вещества и 1,093 г $\text{Woc-}\beta\text{Ala-OPcp}$ (получен аналогично другим пентахлорфениловым эфирам [20], т. пл. 127–129°, состав $\text{C}_{14}\text{H}_4\text{Cl}_5\text{NO}_3$) в 5 мл ДМФА в присутствии 0,404 г триэтиламина. В процессе реакции добавляли 0,2 мл N -метилморфолина. Через 3 сут раствор подкисляли 1 н. H_2SO_4 , пептид высаживали водой, промывали на фильтре, пересаждали из ДМФА водой и промывали эфиром. Выход

1,07 г (70%), т. пл. 208–210°; R_f 0,78 (А); R_f 0,75 (В); R_f 0,90 (В). По данным [19], после перекристаллизации из системы этилцеллозольв — вода при 80° т. пл. 229–230°.

Вос-βAla-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (II). *Z-Ala-Tyr-Gly-OBzl* (IX). Растворяли 10 г *Z-Ala-Tyr-NHNH₂* [21] в 50 мл ДМФА, охлаждали до –20°, добавляли 62 мл 1 н. HCl и раствор 1,325 г NaNO₂ в 5 мл воды. Через 10 мин реакционную смесь разбавляли 150 мл воды и экстрагировали азид CH₂Cl₂. Экстракт промывали 5% NaHCO₃ и насыщенным раствором Na₂SO₄. К суспензии 10,2 г ⁺H₂-Gly-OBzl·TosO[–] в 50 мл CH₂Cl₂ добавляли 3,06 триэтиламина и полученный выше раствор азиды; реакционную смесь упаривали в вакууме при 10° до объема 20 мл и оставляли на 4 сут при 4°. Растворитель удаляли, остаток растворяли в этилацетате, промывали, сушили и снова упаривали. Остаток кристаллизовался при добавлении эфира. Выход 10 г (75%), т. пл. 140–142° (из смеси этанола с эфиром), R_f 0,91 (А); R_f 0,70 (В); R_f 0,37 (Г); $[\alpha]_D^{20}$ –28,8° (с 1, этанол). C₂₃H₃₁N₃O₇.

⁺H₂-Ala-Tyr-Gly-OH·AcO[–] получен гидрированием 8 г пептида (IX) с выходом 5,54 г (100%), R_f 0,4 (А); R_f 0,1 (В); E_{Gly} 1,13.

Вос-Glu(OBu')-Ala-Tyr-Gly-OH (X). К раствору 2,22 г продукта гидрирования в 5 мл воды добавляли 50 мл ДМФА, 1,21 г триэтиламина и 3,58 г *Вос-Glu(OBu')-OPcp* [22]. Через 3 сут раствор разбавляли этилацетатом, промывали, сушили, удаляли растворитель, остаток обрабатывали эфиром и переосаждали из метанола добавлением эфира. Выход 2,94 г (82%), т. пл. 124–126°, R_f 0,65 (А); R_f 0,85 (В); R_f 0,35 (Д); $[\alpha]_D^{20}$ –35,5° (с 1, метанол). C₂₈H₄₄N₄O₁₁. После обработки пробы HCl/AcOH E_{Gly} 0,9, E_{Tyr} 1,33.

Вос-Glu(OBu')-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (XI). Растворяли 1,19 г тетрапептида (X) в 5 мл ДМФА, добавляли 0,288 г оксисулфинида, охлаждали до 0° и добавляли 0,412 г DCC. Через 12 ч отфильтровывали дициклогексимочевину и фильтрат добавляли к раствору 1,266 г ⁺H₂-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂·Cl[–] и 0,404 г триэтиламина в 4 мл ДМФА. Через 4 сут подкисляли 1 н. H₂SO₄, осаждали пептид водой, промывали и перекристаллизовывали из этанола. Выход 1,67 г (71%), т. пл. 205–208°, R_f 0,8 (А); R_f 0,55 (В); R_f 0,9 (В); $[\alpha]_D^{20}$ –21,5° (с 1, AcOH). C₅₇H₈₀N₁₀O₁₇S.

Вос-βAla-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (II). При обработке 1,173 г пептида (XI) HCl/AcOH получено 1,05 г (100%) хлоргидрата октапептида (XII) с R_f 0,53 (А); R_f 0,15 (В); E_{Gly} 0,7; E_{Tyr} 0,96; E_{Trp} 1,08. К раствору 0,526 г (XII) в 2 мл ДМФА добавляли 0,152 г триэтиламина и 0,436 г *Вос-βAla-OPcp*. Через 3 сут раствор подкисляли 1 н. H₂SO₄, пептид высаживали водой, промывали на фильтре водой, этилацетатом, эфиром и кристаллизовали из этанола. Выход 0,475 г (80%), т. пл. 210°; R_f 0,67 (А); R_f 0,61 (В); R_f 0,77 (В); $[\alpha]_D^{20}$ –14,5° (с 0,2, ДМФА). C₅₆H₇₅N₁₁O₁₇S.
⁺H₂-Lys(+H₂)-βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂·2Cl[–] (III).

⁺H₂-βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂·Cl[–] (Ia) получен из 0,46 г пентапептида (I) действием HCl/AcOH с выходом 0,413 г (98%); R_f 0,34 (А); R_f 0,30 (В); E_{Gly} 0,95.

Вос-Lys(Вос)-βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ получали реакцией 0,211 г хлоргидрата пентапептида (Ia) с 0,315 г *Вос-Lys(Вос)-OPcp* [20] и 0,061 г триэтиламина в 2 мл ДМФА. Через 5 сут раствор подкисляли 1 н. H₂SO₄, осаждали пептид водой, промывали на фильтре водой, этилацетатом, эфиром и переосаждали из этанола эфиром. Выход 0,268 г (90%), т. пл. 188–191°; R_f 0,88 (А); R_f 0,94 (В); R_f 0,98 (Е); $[\alpha]_D^{20}$ –32,9° (с 1, ДМФА). C₄₈H₆₉N₉O₁₂S·1,5H₂O.

2Cl·⁺H₂-Lys(+H₂)-βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (III) получен при действии HCl/AcOH на 0,242 г N-защищенного гексапептида. Выход 0,211 г (100%), R_f 0,20 (А); R_f 0,10 (В); R_f 0,45 (Е); E_{Gly} 1,3.

Z-Trp-Orn(+H₂)-Asp-Phe-NH₂·Cl[–] (IV).

Z-Orn(Вос)-Asp-Phe-NH₂. К раствору 0,9 г *H-Asp-Phe-NH₂* [19] и 1,6 г

Z-Orn(Вос)-ONp [23] в 8 мл ДМФА добавляли 0,3 г триэтиламина. Через 4 сут раствор подкисляли 1 н. H_2SO_4 , пептид высаживали водой, промывали водой, этилацетатом, эфиром и пересаждали из ДМФА водой. Выход 1,82 г (94%), т. пл. 170–172°. $C_{31}H_{43}N_5O_{10}$.

Z-Trp-Orn(Вос)-Asp-Phe-NH₂. К остатку, полученному после гидрирования 0,63 г защищенного трипептида в водном этаноле и удаления растворителя, добавляли 3 мл ДМФА, 0,5 г Z-Trp-ONp [24] и 0,16 мл триэтиламина. После процедуры, аналогичной синтезу предшествующего трипептида, выход 0,61 г (75%), т. пл. 202–204°, R_f 0,69 (А).

Z-Trp-Orn(⁺H₂)-Asp-Phe-NH₂·Cl⁻ (IV) получали из 0,13 г защищенного тетрапептида действием HCl/АсОН, пересаждали из АсОН эфиром. Выход 0,102 г (78%), т. пл. 140–141°. $C_{37}H_{44}N_7O_8Cl \cdot 4H_2O$.

Z<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Lys-OMe (V).

Z-<Glu-Gly-Pro-OH (XIII). Гидрировали в метаноле 12,25 г Z-Gly-Pro-OH [21], после отделения катализатора метанол упаривали, маслообразный остаток (E_{Gly} 0,9) растворяли в 50 мл ДМФА, добавляли 5,54 мл триэтиламина и 15,37 г Z-<Glu-ONp [25]. После окончания реакции (7–8 сут) упаривали, остаток подкисляли 1 н. HCl и добавляли небольшое количество воды, выпавшее масло экстрагировали этилацетатом, без промывки сушили Na_2SO_4 и упаривали, остаток закристаллизовывали под гексаном и пересаждали из этилацетата гексаном. Выход 9,18 г (55%) аморфного продукта с т. пл. 75–85°; R_f 0,75 (В); R_f 0,50 (В); $[\alpha]_D^{20}$ –55,3° (с 1, ДМФА). $C_{20}H_{23}N_3O_7 \cdot 0,5 H_2O$. Для гидрированной пробы E_{Gly} 0,25. Дициклогексиламмониевую соль трипептида осаждали эфиром из этилацетата, т. пл. 162–166°, $[\alpha]_D^{20}$ –53,5° (с 1, ДМФА). $C_{32}H_{46}N_4O_7 \cdot 0,5 H_2O$.

Вос-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OMe (XIV). К раствору 0,992 г ⁺H₂-Lys(Z)-OMe·Cl⁻ [26] и 1,6 г Вос-Glu-(OBzl)-ONp [27] в этилацетате добавляли 0,303 г триэтиламина. Через 3 сут этилацетатный раствор промывали, сушили и упаривали, пептид кристаллизовали из эфира. Выход 1,56 г (85%), т. пл. 110–112°; R_f 0,97 (А); R_f 0,97 (В); R_f 0,69 (Г); R_f 0,68 (Ж); $[\alpha]_D^{20}$ –8,1° (с 1, ДМФА). $C_{32}H_{43}N_3O_8$.

Вос-Leu-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OMe (XV). После деблокирования 1,23 г дипептида (XIV) CF_3COOH в CH_2Cl_2 получали маслообразный продукт (R_f 0,9 (А), R_f 0,7 (В), E_{Gly} 1,15), который растворяли в этилацетате и добавляли 0,28 мл триэтиламина и 0,86 г Вос-Leu-ОРср [20]. Через 3 сут этилацетатный раствор промывали и сушили, после упаривания получали плохо кристаллизующийся, замасливающийся продукт. Выход 1,31 г (90%), R_f 0,95 (А); R_f 0,94 (В); R_f 0,70 (Г).

Вос-Trp-Leu-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OMe (XVI). Из 1,163 г пептида (XV) после удаления Вос-защиты получали маслообразный трифторацетат трипептида (R_f 0,88 (А), R_f 0,74 (В), E_{Gly} 1,1), который растворяли в этилацетате, добавляли 0,22 мл триэтиламина и 0,884 г Вос-Trp-ОРср [28] и выдерживали в течение 3 сут. После промывки, высушивания и упаривания раствора остаток кристаллизовали в эфире. Выход 1,25 г (86%), т. пл. 145–147°; R_f 0,62 (Г); R_f 0,37 (Ж); $[\alpha]_D^{20}$ –14,1° (с 1, ДМФА). $C_{49}H_{64}N_6O_{11}$.

⁺H₂-Trp-Leu-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OMe·Cl⁻ получали из 0,548 г пептида (XVI) действием HCl/АсОН с выходом 0,51 г (100%); R_f 0,65 (В); R_f 0,91 (А); E_{Gly} 0,60; E_{Trp} 1,1.

Z-<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OMe (XVII). К раствору 0,3 г полученного выше хлоргидрата тетрапептида в 3 мл ДМФА добавляли 0,039 мл N-метилморфолина, 0,146 г трипептида (XIII), 0,04 г оксисукцинимиды и 0,072 г DCC. Через 2 сут отфильтровывали осадок дициклогексилмочевины, фильтрат подкисляли 1 н. HCl и осаждали пептид водой. Осадок промывали на фильтре 5% $NaHCO_3$, водой, 1 н. HCl, водой, этилацетатом, эфиром, высушивали в вакууме и пересаждали из метанола

эфиром. Выход 0,318 г (75%), т. пл. 208–210°; R_f 0,91 (А); R_f 0,92 (В); R_f 0,64 (Д); R_f 0,97 (Е); $[\alpha]_D^{20} -44^\circ$ (с 1, ДМФА). $C_{64}H_{79}N_9O_{16}$.

<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Lys-OMe (V) получали гидрированием 0,29 г защищенного гептапептида (XVII) в смеси AcOH–MeOH (1:1) и пересаждали из метанола эфиром. Выход 0,194 г (95%), R_f 0,21 (А); R_f 0,49 (Е); E_{Gly} 0,8; E_{Trp} 1,45. Аминокислотный состав: Glu 2,1, Gly 0,9, Pro 0,97, Trp 0,80, Leu 1,0, Lys 1,0.

<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-OH (VI). Boc-Leu-Glu(OBzl)₂ (XVIII). Растворяли в CH_2Cl_2 2,24 г $^+H_2-Glu(OBzl)_2 \cdot TosO^-$ и 0,51 г триэтиламина, добавляли 2,45 г Boc-Leu-OPср и выдерживали 3 сут. Выход маслообразного продукта 2,4 г (90%), R_f 0,90 (А); R_f 0,95 (В); R_f 0,80 (Г).

Boc-Trp-Leu-Glu(OBzl)₂ (XIX). Из 2,07 г пептида (XVIII) действием HCl/AcOH получали 1,82 г (100%) $^+H_2-Leu-Glu(OBzl)_2 \cdot Cl^-$, имеющего R_f 0,78 (В); R_f 0,75 (В); R_f 0,10 (Г); E_{Gly} 1,1; 1,7 г этого продукта растворяли в этилацетате, добавляли 0,41 г триэтиламина и 2,21 г Boc-Trp-OPср [28]. Через 4 сут раствор промывали, сушили и после упаривания растворителя кристаллизовали остаток в эфире. Выход 2,38 г (82%), т. пл. 124–126°; R_f 0,97 (А); R_f 0,95 (В); R_f 0,71 (Г); $[\alpha]_D^{20} -28,2^\circ$ (с 1, ДМФА). $C_{41}H_{50}N_4O_8$.

Z-<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu(OBzl)₂ (XX). Из 2,18 г пептида (XIX) при действии HCl/AcOH получали 1,94 г (98%) $^+H_2-Trp-Leu-Glu(OBzl)_2$ с R_f 0,90 (А); R_f 0,45 (В); E_{Gly} 0,0. К раствору 1,326 г этого продукта в 10 мл ДМФА добавляли 0,22 мл N-метилморфолина, охлаждали до -10° и прибавляли 0,834 г трипептида (XIII), 0,23 г оксисукцинимиды и 0,412 г DCC. Выдерживали 20 ч при 0° и 24 ч при 20° , добавляли несколько капель AcOH, через 1 ч фильтровали и обрабатывали фильтрат, как описано при синтезе (XVII). Выход 1,44 г (70%), т. пл. 194–196°; R_f 0,95 (А); R_f 0,90 (В); R_f 0,36 (Д); $[\alpha]_D^{20} -48,9^\circ$ (с 1, ДМФА). $C_{56}H_{65}N_7O_{13}$.

<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-OH (VI) получали гидрированием 1,026 г пептида (XX) в смеси AcOH–MeOH. После пересаживания из метанола эфиром выход 0,668 г (94%); R_f 0,48 (А); R_f 0,42 (В); E_{Gly} 0,20.

<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Gly-OH (VII). Boc-Leu-Gly-OBzl (XXI). Растворяли в CH_2Cl_2 1,01 г N-метилморфолина, 3,38 г $^+H_2-Gly-OBzl \cdot TosO^-$ и 4,79 г Boc-Leu-OPср [20]. Через 3 сут разбавляли реакционную смесь этилацетатом, промывали, сушили и упаривали, маслообразный остаток сушили над P_2O_5 в вакууме. Выход 3,42 г (90%), R_f 0,88 (А); R_f 0,93 (В); R_f 0,75 (Г).

$^+H_2-Leu-Gly-OBzl \cdot Cl^-$. Из 3,4 г дипептида (XXI) после удаления Boc-защиты действием HCl/AcOH получали некристаллизующийся продукт, который сушили в вакууме над KOH. Выход 2,83 г (100%), R_f 0,74 (А); R_f 0,61 (В); E_{Gly} 1,25.

Boc-Trp-Leu-Gly-OBzl (XXII). К этилацетатному раствору 1,26 г полученного выше хлоргидрата добавляли 0,41 г триэтиламина и 2,21 г Boc-Trp-OPср, через 3 сут промывали, сушили и упаривали, пептид кристаллизовали из эфира при добавлении небольшого количества гексана. Выход 1,87 г (83%), т. пл. 166–167°; R_f 0,98 (А); R_f 0,95 (В); R_f 0,60 (Г); $[\alpha]_D^{20} -24,6^\circ$ (с 1, ДМФА). $C_{31}H_{40}N_4O_6$.

$^+H_2-Trp-Leu-Gly-OBzl \cdot Cl^-$ получен действием HCl/AcOH из 2,54 г трипептида (XXII) с выходом 2,16 г (96%); R_f 0,95 (А); R_f 0,67 (В); E_{Gly} 0,90; E_{Trp} 1,30.

Z-<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Gly-OBzl (XXIII). К раствору 1,252 г полученного выше хлоргидрата в ДМФА добавляли 0,252 г N-метилморфолина, охлаждали до -10° и прибавляли 1,043 г пептида (XIII), 0,3 г оксисукцинимиды и 0,515 г DCC. Обработку реакционной смеси проводили, как описано при синтезе (XVII). Выход 1,53 г (71%) аморфного вещества; R_f 0,90 (А); R_f 0,80 (В); R_f 0,29 (Д); $[\alpha]_D^{20} -42^\circ$ (с 1, ДМФА). $C_{46}H_{55}N_7O_{10}$.

<Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Gly-OH (VII) получали гидрированием в метаноле 1,123 г пептида (XXIII), продукт осаждали из метанола эфиром. Выход 0,79 г (95%), R_f 0,65 (А); R_f 0,42 (В); E_{Gly} 0,30.

Конъюгация пептида (II) с человеческим сывороточным альбумином при помощи 2,4-динитро-1,5-дифторбензола. Перед конъюгацией пептида (II) производили удаление Вос-группы действием HCl/AsOH; R_f 0,47 (A); R_f 0,10 (B); E_{Gly} 0,70. Растворяли 0,1 ммоль пептида в 2 мл 7 М раствора хлоридрата гуанидина в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5, добавляли 5-кратный объем раствора динитродифторбензола в метаноле (30 мг/мл) и перемешивали 10–15 мин при 20°. Затем охлаждали до 0° и добавляли 4-кратный объем эфира, интенсивно перемешивали и отделяли верхний слой, приливали 3-кратный объем эфира, при этом осаждались солянокислый гуанидин, соли и пептид. Эфир сливали, снова доливали 10-кратный объем эфира и через 10 мин декантировали. Растворяли 2 мкмоль альбумина в 2 мл 0,1 М боратного буфера, pH 9,5, и добавляли к полученному ранее осадку. Выдерживали в темноте при 20° в течение суток. Затем для разрушения непрочных связей белка с пептидом через остатки тирозина добавляли 0,1 г дитиозеритрита. Для выделения конъюгата раствор пропускали через колонку с сефадексом G-25; первый пик, отвечающий белковому компоненту реакционной смеси, собирали и лиофилизировали. На основании данных аминокислотного анализа конъюгатов, приведенных в табл. 2, рассчитывали «степень конъюгации» — среднее количество молей пептида, ковалентно связанных с 1 моль белка.

Конъюгация с помощью 2,4-толуилендиизоцианата. Растворяли 0,13 г сывороточного альбумина или 0,09 г (2 мкмоль) овальбумина в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,5, и при сильном перемешивании добавляли 2 мл толуилендиизоцианата. Через 10–15 мин охлаждали до 0° и перемешивали еще 30 мин, выдерживали 1 ч при 0° без перемешивания и отфильтровывали диизоцианат через стеклянный фильтр № 2 без вакуума. К фильтрату добавляли раствор 0,1 ммоль пептида в 85 мл боратного буфера, pH 9,5, перемешивали в течение 1 ч при 37°, добавляли несколько капель 25% NH₄OH и диализовали против воды в течение 2–3 сут. После лиофилизации продукт растворяли в небольшом объеме воды и хроматографировали на сефадексе G-25, белковую фракцию лиофилизировали.

Конъюгация пептида (VII) с белками с помощью водорастворимого карбодиимида. Пептид (VII), не имеющий свободной аминогруппы, не может быть конденсирован с белками описанными выше способами; в этом случае использовали активацию карбоксильных групп пептида карбодиимидом. К раствору 2 мкмоль альбумина и 0,1 ммоль пептида (VII) в воде добавляли 0,1 ммоль хлоридрата 1-этил-3-диметиламинопропилкарбодиимида; после перемешивания в течение 1 ч при 20° подкисляли 0,1 н. HCl до pH 5 и через сутки лиофилизировали. В случае реакции с овальбумином при добавлении карбодиимида появлялся осадок, который отделяли перед лиофилизацией. Конъюгаты выделяли хроматографией на сефадексе G-25. В случае конъюгата овальбумина степень конъюгации в осадке, выпавшем при реакции, и в растворимом продукте одинакова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gregory R. A., Tracy H. J. (1964) *Gut.*, 5, 103–109.
2. Anderson J. C., Barton M. A., Gregory R. A., Hardy P. M., Kenner G. W., McLeod J. K., Preston J., Sheppard R. C. (1964) *Nature*, 204, 933–934.
3. Morley J. S. (1968) *Proc. Roy. Soc. Biol.*, 170, 97–110.
4. Rosenquist J. L., Holmquist A. M. (1974) *Immunochemistry*, 11, 489–494.
5. Полосатов М. В., Самарцев М. А., Климов П. К., Прусаков А. Н. (1975) *Докл. АН СССР*, 225, 235–237.
6. Баранкова Г. М., Прусаков А. Н., Полосатов М. В., Климов П. К. (1978) *Физиол. ж. СССР*, 64, 1348–1352.
7. Wünsch E., Jäger E., Kisfaludy L., Löw M. (1977) *Angew. Chem.*, 89, 330–331.
8. Suzuki K., Endo N., Nitta K., Sasaki Y. (1978) *Chem. Pharm. Bull.*, 96, 2198–2204.
9. Ogawa H., Sugiura M., Yajima H., Sakurai H., Tsuda K. (1978) *Chem. Pharm. Bull.*, 96, 1549–1557.
10. Kier L., George J. (1972) *J. Med. Chem.*, 15, 384–386.
11. Morley J. S. (1968) *Feder. Proc.*, 27, 1314–1322.

12. Schick A. F., Singer S. J. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 2477-2483.
13. Goodfriend T. L., Levine L., Fasman G. D. (1964) *Science*, **144**, 1344-1345.
14. Tager H. S. (1976) *Anal. Biochem.*, **71**, 367-375.
15. Zervas L., Winitz M., Greenstein J. (1957) *J. Org. Chem.*, **22**, 1515-1518.
16. McMenamy R. H., Dintzis H. M., Watson F. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 4744-4750.
17. Fevold H. L. (1951) *Adv. Protein Chem.*, **6**, 187.
18. Simpson R. J., Neuberger M. R., Liu T.-J. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 1936-1940.
19. Davey J. M., Laird A. H., Morley J. S. (1966) *J. Chem. Soc.*, **C**, 555-564.
20. Johnson B. J., Trask E. (1968) *J. Org. Chem.*, **33**, 4521-4524.
21. Agarwal K. L., Kenner G. W., Sheppard R. C. (1968) *J. Chem. Soc.*, **C**, 1384-1390.
22. Visser S., Raap J., Kerling K. E. T., Havinga E. (1970) *Rec. trav. chim.*, **89**, 865-875.
23. Tesser G. I., Schwyzer R. (1966) *Helv. Chim. Acta*, **49**, 1013-1022.
24. Wilchek M., Patchornik A. (1963) *J. Org. Chem.*, **28**, 1874-1875.
25. Gibian H., Klieger E. (1961) *Lieb. Ann.*, **640**, 145-156.
26. Shiba T., Kaneko T. (1960) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **33**, 1721-1723.
27. Li C. H., Gorup B., Chung D., Ramachandran J. (1963) *J. Org. Chem.*, **28**, 178-181.
28. Johnson B. J. (1973) *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1019-1021.

Поступила в редакцию
3.VIII.1978

После доработки
10.X.1978

SYNTHESIS OF GASTRIN TERMINAL FRAGMENTS AND THEIR COUPLING TO PROTEINS

PRUSAKOV A. N., SAMARTSEV M. A., MARTYNOV V. F.

A. A. Zhdanov Leningrad State University, Leningrad

The syntheses of gastrin fragments 1-6, 10-17, 14-17, and their analogs [Gly⁶]gastrin 1-6, [Lys-⁷OMe]gastrin 1-7, [Lys¹², β-Ala¹³]gastrin 12-17, and [Orn¹⁵]gastrin 14-17 were described. According to physiological tests, the introduction of an additional ionic group into active fragment of the hormone decreased its potency to stimulate the acid secretion. None of the above peptides inhibited pentagastrin stimulated secretion. The efficiency of different methods, namely using toluenediisocyanate, 2,4-dinitro-1,5-difluorobenzene, or water soluble carbodiimide, was assessed in coupling gastrin fragments to human serum albumin and to ovalbumin.