



УДК 547.963.4.07

СИНТЕЗ ГЕКСАДЕКАПЕПТИДА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 23—38 ЦИТОХРОМА *c* СЕРДЦА ЛОШАДИ

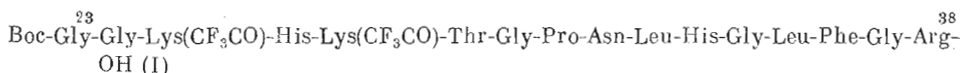
*Вольская Н. Е., Васильева Г. А., Амелина В. Н.,
Филенкова Н. В., Евстигнеева Р. П.*

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

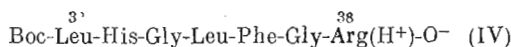
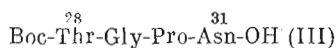
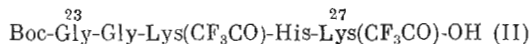
Методами классической пептидной химии в растворе осуществлен синтез гексадекапептида, отвечающего последовательности 23—38 белковой цепи цитохрома *c* сердца лошади.

Реализация структурно-функционального подхода к изучению белков, и в частности цитохрома *c*, требует наличия различных по величине и строению фрагментов белка. В связи с этим в последние годы интенсивно развиваются синтетические исследования в области цитохрома *c*. В основном они касаются получения пептидов С-концевой последовательности гемопротейда [1—4].

Нами ранее осуществлен синтез N-терминального гептпептида, включающего 22 аминокислотных остатка [5]; настоящая работа является продолжением этих исследований и посвящена получению 16-членного пептида (I), соответствующего участку 23—38 полипептидной цепи цитохрома *c* сердца лошади.



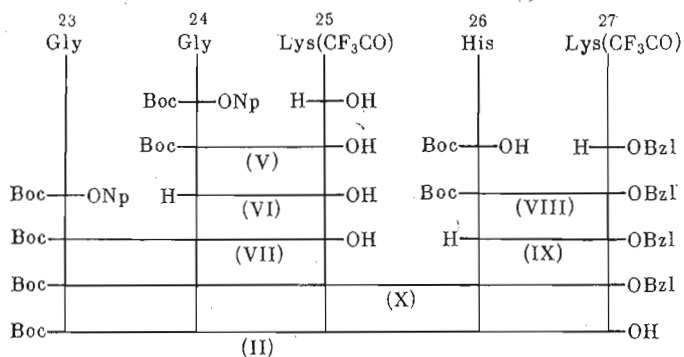
Общий подход, используемый нами в процессе синтеза пептидных фрагментов цитохрома *c*, заключается в применении методов классической пептидной химии с минимальной защитой боковых групп трифункциональных аминокислот. Поэтому в ходе работы постоянной защитой блокировалась только ϵ -аминогруппа лизина (трифторацетильной группировкой). Удачное использование в последние годы N^G незамещенного аргинина в пептидном синтезе [6, 7] было учтено при разбивке гексадекапептида на фрагменты, покрывающие последовательность 23—38 гемопротейда:



Пентапептид (II), отвечающий участку 23—27 белковой цепи цитохрома *c*, получен по схеме 1.

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

Схема 1



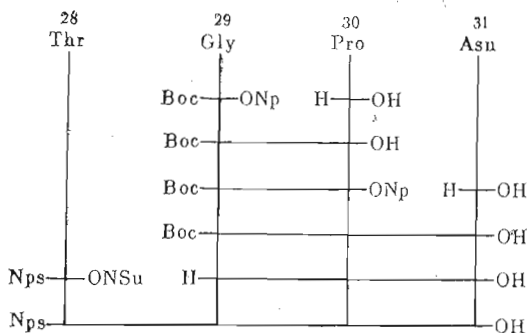
Трипептид (VII) синтезировали последовательным парашиванием с С-конца методом активированных (*n*-нитрофениловых) эфиров в водно-диоксановой среде в присутствии 1,2,4-триазола в течение 1,5 ч, затем растворитель упаривали и реакцию проводили в диметилформамиде (ДМФА) еще 24 ч при 20° С. Суммарный выход трипептида (VII) в расчете на исходный N^ε-трифторацетил-*L*-лизин составил 35%. Относительно невысокий выход соединения (VII) можно объяснить частичным гидролизом активированного эфира глицина в условиях реакции.

Гистидинсодержащий дипептид (VIII) получен методом смешанных ангидридов в ДМФА с выходом 81%. Конденсацию ди- и трипептидов проводили тремя методами: методом смешанных ангидридов, дициклогексилкарбодиимидным методом и при совместном использовании дициклогексилкарбодиимида и 1-оксисбензотриазола. Лучшие результаты были получены с помощью последнего метода. При этом выход целевого соединения (X) составил 80% против 22% по методу смешанных ангидридов. Углы оптического вращения пептидов в обоих случаях совпадали.

Бензильная защита С-концевой аминокислоты пептида (X) удалялась переносным гидрированием в циклогексене с использованием 10% палладия на угле [8].

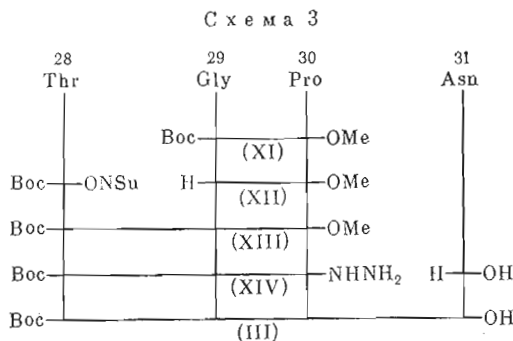
Синтез тетрапептида (III) последовательности 28—31 проводили по двум схемам. На схеме 2 представлено применение для этой цели метода активированных эфиров.

Схема 2



Реакции проводили в обычных при наличии незамененной карбоксильной группы условиях: диоксан — вода, 1,2,4-триазол — в случае дипептида; тетрагидрофуран — вода, триэтиламин, 1,2,4-триазол — для аспарагинсодержащего трипептида. Выходы соединений составили 28—

60%. Во всех случаях в процессе реакции наблюдали частичный гидролиз активированных эфиров аминокислоты и пептида. Синтез тетрапептида проводили в ДМФА, однако выход его не превышал 15% (после хроматографической очистки). Поэтому для получения препаративных количеств пептида (III) была разработана другая схема, которая предусматривала фрагментную конденсацию трипептида с незамещенным аспарагином.



Метилловый эфир N^{α} -трет-бутилоксикарбонил-*L*-треонилглицил-*L*-пролина (XIII) получен методом активированных эфиров в хлороформе в присутствии ледяной уксусной кислоты с выходом 72%. Присоединение аспарагина к трипептиду проводили методом окисления гидразидов [9]. При гидразинолизе метилового эфира трипептида, имеющего *o*-нитро-фенилсульфенильную защитную группировку N -концевого треонина, в обычных условиях (25-кратный избыток гидразингидрата, 20°С) наблюдалось ее частичное расщепление, поэтому в дальнейшем использовали только N^{α} -трет-бутилоксикарбонильное производное треонина.

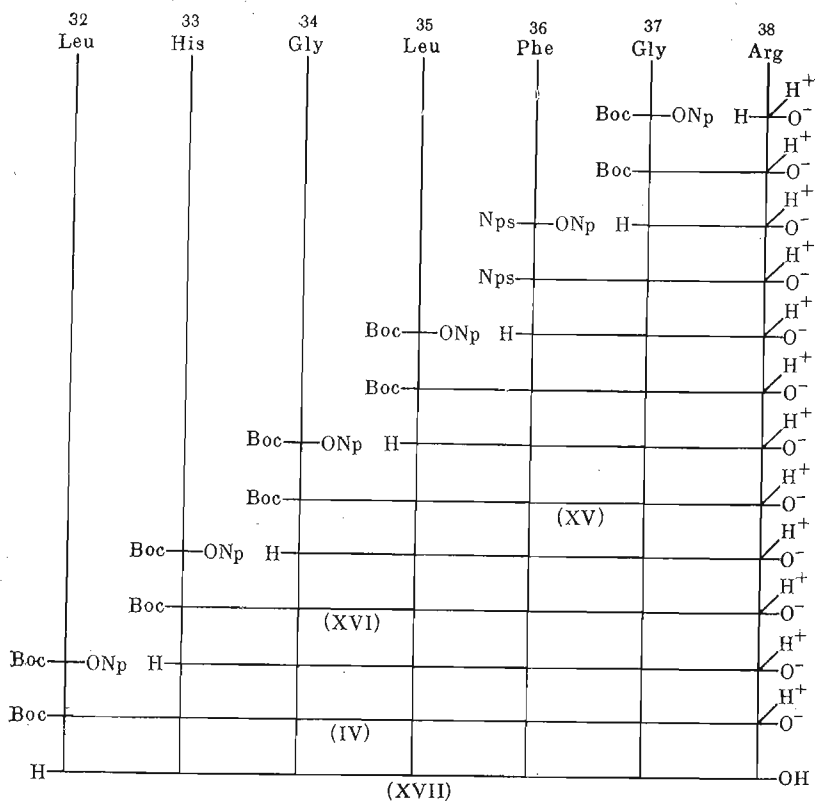
Конденсацию гидразида трипептида, отвечающего участку 28—30 белковой цепи цитохрома *c*, с аспарагином проводили в смеси вода — тетрагидрофуран (1 : 4) в присутствии 5 экв. триэтиламина и 5 экв. вода в пиридине. Время реакции при 0°С составило 2 ч. После хроматографической очистки выход целевого соединения (III) был 86,7%.

Синтез гептапептида (IV), отвечающего участку 32—38 полипептидной цепи гемопротейда, осуществлен последовательным удлинением аминокислотной цепи с C -конца по схеме 4.

Наличие C -концевого незамещенного аргинина предполагало проведение реакций методом активированных эфиров в смеси диоксан — вода в присутствии 1,2,4-триазола [6]. В этих условиях N^{ϵ} -гуанидиновая группа аргинина оказывается протонированной, так как ее основность значительно выше основности α -аминофункций аминокислот и эфиров аминокислот (pK 12,5 против 9,25 и 8,0 соответственно).

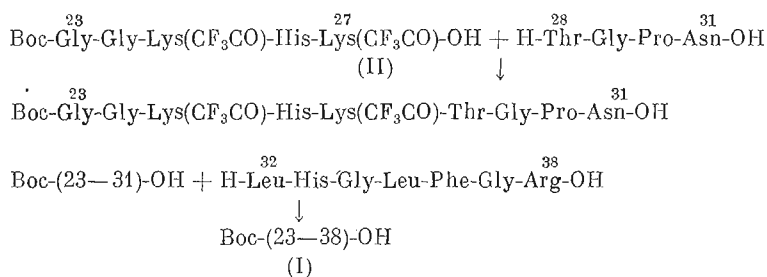
До стадии образования пентапептида последовательности 34—38 синтез проводили без выделения промежуточных соединений. Защитные группировки α -аминогрупп пептидов удалялись обработкой 2 н. раствором хлористого водорода в метаноле. Время реакций в процессе получения пентапептида (34—38) составляло 2, 12, 72 и 12 ч при присоединении глицина, фенилаланина, лейцина и глицина соответственно. Причем заметного гидролиза активированных эфиров в описанных условиях не наблюдалось, и выход пентапептида в расчете на исходный аргинин составил 76,7%. При синтезе гексапептида время конденсации составляло уже 10 сут. После хроматографической очистки выход последнего не превышал 60%. Целевой гептапептид после двукратной хроматографической очистки получен с выходом 50%. Таким образом, данная схема при относительно большом времени синтеза позволила получить аргининсодержа-

С х е м а 4



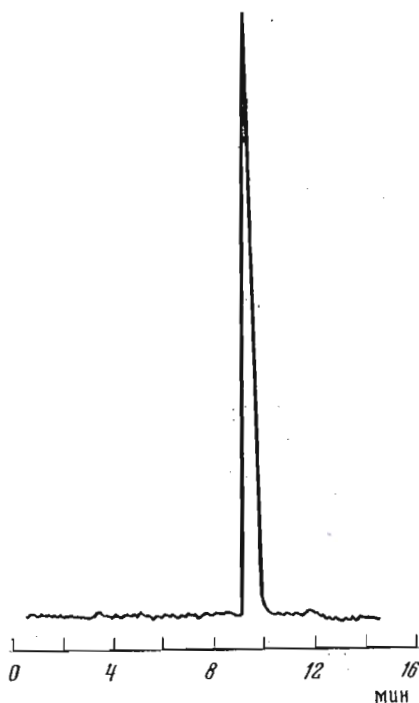
щий пептид с суммарным выходом 23% в расчете на исходную аминокислоту.

Конденсация фрагментов, соответствующих участкам 23—27, 28—31 и 32—38 белковой цепи цитохрома с сердца лошади, проводилась в последовательности



Для создания α-амидной связи был использован метод смешанных ангидридов. В качестве ангидридообразующего агента применяли пивалоилхлорид. Конденсацию пентапептида с тетрапептидом осуществляли в хлороформе с добавлением пиридина и триэтиламина. Выход нонапептида после перекристаллизации из этилацетата составил 57%.

При получении гексадекапептида (I) реакцию проводили в ДМФА с добавлением ледяной уксусной кислоты из-за очень плохой растворимости аминного компонента синтеза (аргининсодержащего пептида). Спустя 72 ч гексадекапептид был выделен с выходом 12%. Очевидно, данный вариант соединения фрагментов при синтезе заданного участка последовательности белка не совсем удачен для синтеза препаративных количеств



Профиль элюции гексадекапептида Вос-(23-38)-ОН на колонке Lichrosorb RP-8 (5 мкм, 25 см×4,6 мм) с элюцией смесью метанол-0,01 М аммоний-ацетатный буфер (7:3). Скорость потока 1 мл/мин, давление 40 атм

вещества. Это было учтено в дальнейшем при получении 34-членного пептида, отвечающего участку 23-56 аминокислотной цепи цитохрома с, когда аргининсодержащий пептид (IV) использовали в качестве карбоксильного компонента синтеза.

Гомогенность синтетического гексадекапептида (I) доказана кроме обычных методов применением жидкостной хроматографии высокого давления на обращенной фазе (см. рисунок); выбранный режим хроматографии обеспечивал надежное разделение целевого соединения и возможных примесей.

Экспериментальная часть

Индивидуальность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем Silufol в системах: хлороформ-метанол-ацетон, 70:15:15 (А); хлороформ-ацетон, 1:1 (Б); *n*-бутанол-уксусная кислота-вода, 13:2:5 (В); пропанол-вода, 7:3 (Г); метанол-хлороформ, 8:2 (Д). Обнаружение проводили нингидрином и реактивом Сакагучи. N-Концевые аминокислоты определяли дансильным методом. Данные элементного и аминокислотного анализов

синтезированных пептидов соответствовали вычисленному содержанию С, Н, N и соотношениям аминокислот (брутто-формулы соединений приведены по данным анализа). Кислотный гидролиз пептидов 5,7 н. HCl проводили в запаянной ампуле при 110° С в течение 24-72 ч в зависимости от состава пептидов. Аргининсодержащий гептапептид гидролизывали, кроме того, при 150° С в течение 2 ч. Вращение определяли при 20-25° С на цифровом спектрофотометре Perkin-Elmer 241-МС (Швеция), длина кюветы 1 дм. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе ВС-200 (ФРГ). Жидкостную хроматографию осуществляли на приборе SP-8000 (Spectra-Physics), колонка Lichrosorb RP-8, 5 мкм, 25 см×4,6 мм с элюцией смесью метанол-0,01 М аммоний-ацетатный буфер (7:3). В работе использованы аминокислоты, производимые фирмой Reanal (ВНР).

Вос-Gly-Lys (CF_3CO)-ОН (V). К раствору 0,6 г (2,48 ммоль) N^ε-трифторацетиллизина в 10 мл воды добавляли 0,1 мл 5% NaHCO₃ (pH 7,5), 0,611 г (2,06 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-глицина в 21 мл диоксана и 0,425 г (6,17 ммоль) 1,2,4-триазола. Через 1,5 ч растворитель упаривали досуха, остаток растворяли в ДМФА. После перемешивания в течение 24 ч при 20° С осадок отфильтровывали, раствор разбавляли 260 мл воды, подкисляли 1 н. H₂SO₄ до pH 6. Дипептид экстрагировали этилацетатом. Высушивали над MgSO₄, этилацетат упаривали. Вещество очищали на колонке с силикагелем Л 40/100 мкм. Дипептид (V) элюировали ацетоном. Выход 0,482 г (58,5%); т. пл. 38-40° С; R_f 0,14 (Б), 0,85 (В). Брутто-формула C₁₅H₂₄O₇N₃F₃.

Вос-Gly-Gly-Lys (CF₃CO)-OH (VII) синтезирован аналогично из 0,39 г (1,16 ммоль) хлоргидрата дипептида (VI) (получен при обработке 0,464 г дипептида (V) 3,2 н. раствором хлористого водорода в метаноле) и 0,258 г (0,87 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонилглицина. Выход 0,229 г (57,7%); т. пл. 103–105° С; *R*₁ 0,36 (А), 0,87 (В). Брутто-формула C₁₇H₂₇O₈N₃F₃.

Вос-His-Lys-(CF₃CO)-OBzl (VIII). *трет*-Бутилоксикарбонилгистидин [0,244 г (0,955 ммоль)] растворяли в 12 мл ДМФА, добавляли 0,154 мл (1,91 ммоль) пиридина и 0,132 мл (0,955 ммоль) триэтиламина. При 0° С прибавляли 0,117 мл (0,955 ммоль) пивалоилхлорида и спустя 40 мин 0,282 г (0,764 ммоль) хлоргидрата бензилового эфира *N*^ε-трифторацетиллизина в 6 мл ДМФА, содержащего 0,117 мл (0,955 ммоль) триэтиламина, и перемешивали 24 ч при 20° С. Осадок отфильтровывали, раствор разбавляли 150 мл воды, подщелачивали 50% K₂CO₃ до pH 9, дипептид экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный раствор промывали водой, сушили над MgSO₄, упаривали. Дипептид кристаллизовался при добавлении эфира. Выход 0,352 г (81%); т. пл. 44–45° С; *R*₁ 0,34 (А), 0,47 (В), [α]_D²⁰ –13° (с 1, MeOH). Брутто-формула C₂₆H₃₁O₇N₃F₃.

Вос-Gly-Gly-Lys(CF₃CO)-His-Lys(CF₃CO)-OBzl (X). К раствору 1,1 г (1,7 ммоль) тозилата дипептида (IX) (получен при обработке 0,97 г дипептида (VIII) 3 н. раствором *n*-толуолсульфокислоты в метаноле) в 10 мл хлороформа добавляли 3,4 мл (3,3 ммоль) *N*-метилморфолина. При –10° С прибавляли 0,77 г (1,7 ммоль) трипептида (VII) в 35 мл хлороформа, 0,6 г (3,4 ммоль) 1-оксисбензотриазола и 0,35 г (1,7 ммоль) дициклогексилкарбодимида в 4 мл хлороформа. Через 20 ч перемешивания при 20° С растворитель упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали последовательно 5% NaHCO₃, водой, 0,1 н. H₂SO₄, водой. После высушивания над MgSO₄ этилацетат упаривали. Выход 1,1 г (80%); т. пл. 57–59° С (хлороформ – гексан); *R*₁ 0,77 (В) 0,56 (А); [α]_D²⁰ –12° (с 1, MeOH). Брутто-формула C₃₃H₅₁O₁₂N₉F₆. Аминокислотный состав: Gly 1,92; Lys 1,90; His 1,00.

Вос-Thr-Gly-Pro-Ome (XIII). К раствору 1,394 г (6,25 ммоль) хлоргидрата дипептида (XII) (получен при обработке 1,79 г (XI) 3,2 н. раствором HCl в метаноле) в 30 мл хлороформа добавляли 1,25 мл (12,5 ммоль) *N*-метилморфолина и 1,424 г (4,5 ммоль) *N*-оксисукцинимидного эфира *трет*-бутилоксикарбонилтреонина. Через 1 ч растворитель упаривали. Остаток растворяли в этилацетате и промывали последовательно 5% NaHCO₃, водой, 0,1 н. H₂SO₄, водой. После высушивания над MgSO₄ этилацетат упаривали. Остаток очищали на колонке с силикагелем Л 100/160 мкм. Трипептид элюировали ацетоном. Выход 1,26 г (72%); т. пл. 96–98° С; *R*₁ 0,6 (А), 0,76 (В); [α]_D²⁰ –82° (с 1, MeOH). Брутто-формула C₁₇H₂₆O₇N₃.

Вос-Thr-Gly-Pro-Asn-OH (III). К раствору 0,199 г (0,513 ммоль) гидразида трипептида (XIV) (получен при обработке 0,199 г метилового эфира трипептида (XIII) 40-кратным избытком гидразингидрата в течение 24 ч при 20° С) в 10 мл ТГФ добавляли 0,154 г (1,03 ммоль) аспарагина в 3 мл воды. Смесь охладили до 0° С и добавляли 0,356 мл (5 экз.) триэтиламина и 0,65 г (5 экв.) иода в 1 мл пиридина. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0° С. Растворитель упаривали, вещество очищали на колонке с силикагелем Л 100/160 мкм. Тетрапептид элюировали смесью хлороформ – ацетон (6:4) и перекристаллизовывали из этилацетата. Выход 0,224 г (86,7%); т. пл. 177–179° С; *R*₁ 0,58 (В), 0,42 (Г). Брутто-формула C₂₀H₃₃O₉N₅.

Вос-Leu-His-Gly-Leu-Phe-Gly-Arg-OH (IV) получали последовательным наращиванием цепи с С-конца методом активированных (*n*-нитрофениловых) эфиров с использованием в качестве катализатора 1,2,4-триазола. Отщепление *трет*-бутилоксикарбонильной (*o*-нитрофенилсульфенильной) защитной группировки проводили действием 5-кратного избыт-

ка 3,7 н. раствора HCl в метаноле в течение 15–30 мин. Хлоргидраты пептидов нейтрализовали N-метилморфолином. Конденсацию с последующей аминокислотой проводили в смеси вода–диоксан в соотношении 1–1,2 : 2,5 в течение 2–72 ч в зависимости от длины пептида.

Пентапептид (XV) кристаллизовали пересаживанием из смеси метанол–ацетон. Выход 74,2% (считая на исходную аминокислоту); т. пл. 194–196°С; R_f 0,81 (В), 0,6 (Д), $[\alpha]_D^{20}$ -7° (с 1, MeOH).

При получении гексапептида (XVI) количество 1,2,4-триазола было увеличено до 2 экв., а время реакции возросло до 168 ч при 20°С. При выделении маслообразный гексапептид (XVI) очищали на колонке с силикагелем Л 40/100 мкм, элюируя вещество смесью ацетон–метанол, 9,5:0,5. Выход на этой стадии равнялся 60%.

При синтезе гептапептида (IV) время реакции составило 192 ч. Очистку гептапептида проводили на колонке с силикагелем Л 40/100 мкм, вещество элюировали ацетоном. Выход гептапептида (IV) 50%; т. пл. 80–82°С (ацетон); R_f 0,47 (Г), 0,6 (Д), $[\alpha]_D^{22}$ -22° (с 1, MeOH). Аминокислотный состав: Arg 0,92; Gly 2,00; Leu 1,81; Phe 0,91; His 0,78.

Вос-Gly-Gly-Lys (CF₃CO)-His-Lys (CF₃CO)-Thr-Gly-Pro-Asn-OH (23–31). а) 0,5 г (0,56 ммоль) бензилового эфира пентапептида (X) растворяли в 20 мл этанола, добавляли 10 мл циклогексена и 0,25 г 10% палладия на угле. После перемешивания в течение 48 ч при 20°С уголь отфильтровывали, растворитель упаривали. Пентапептид (II) выделяли добавлением эфира. Выход 0,42 г (93%); т. пл. 185–187°С (хлороформ–гексан); R_f 0,24 (В), 0,81 (Г), $[\alpha]_D^{20}$ -4° (с 1, MeOH).

б) 0,250 г (0,31 ммоль) пентапептида (II) растворяли в 7 мл хлороформа. При 0°С прибавляли 0,05 мл (0,62 ммоль) пиридина, 0,043 мл (0,31 ммоль) триэтиламина, 0,038 мл (0,31 ммоль) пивалоилхлорида и спустя 30 мин 0,156 г (0,37 ммоль) хлоргидрата тетрапептида (получен при обработке 0,200 г тетрапептида (III) 3 н. хлористым водородом в метаноле) в 10 мл хлороформа, содержащего 0,3 мл триэтиламина. После перемешивания при 20°С в течение 3 ч растворитель упаривали. Остаток растворяли в этилацетате и промывали последовательно водой, 0,1 н. H₂SO₄, водой, сушили над MgSO₄, упаривали. При добавлении эфира вещество кристаллизовалось. Выход 0,200 г (57%); т. пл. 167–169°С (этилацетат); R_f 0,84 (Г), 0,26 (А); $[\alpha]_D^{25}$ -24° (с 1, MeOH). Аминокислотный состав: Gly 3,0; Lys 1,9; His 0,9; Thr 0,8; Pro 0,9; Asp 0,9.

Вос-(23–38)-OH (I) получен методом смешанных ангидридов аналогично из 0,1 г (85 мкмоль) нонапептида Вос-(23–31)-OH и 0,11 г (102 мкмоль) гептапептида (XVII) с выходом 12%; т. пл. 107–110°С (этилацетат), R_f 0,8 (В), 0,69 (Г); $[\alpha]_D^{20}$ -18° (с 1, MeOH). Аминокислотный состав: Leu 1,60; His 2,05; Gly 5,00; Phe 0,87; Arg 1,12; Lys 2,33; Thr 1,09; Pro 0,69; Asp 0,91.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moroder L., Borin G., Filippi B., Stivanello D., Marchiori F. (1977) *Int. J. Peptide Protein Res.*, **10**, 81–101.
2. Barstow L. E., Young R. S., Yakali E., Sharp J. J., O'Brien J. C., Bermann R. W., Harbury H. A. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4248–4250.
3. Evstigneeva R. P., Vasilieva G. A., Voljskaja N. E., Mironov A. F. (1978) *FRG—USSR Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins*, pp. 3–5, Grainau/Eibsee.
4. Васильева Г. А., Вольская Н. Е., Ковалева Н. С., Миронов А. Ф., Евстигнеева Р. П. (1977) Тез. докл. IV Всес. симпозиума по химии белков и пептидов, т. 166, Минск.
5. Vasilieva G. A., Mironov A. F., Evstigneeva R. P. (1976) *USSR—FRG Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins*, p. 58, Dushanbe.
6. Впровец С. И., Мартынов В. Ф., Титов М. И. (1968) *Ж. общ. химии*, **38**, 2337–2342.
7. Филатова М. П., Крит Н. А., Сучкова Г. С., Равдель Г. А., Иванов В. Т. (1975) *Биоорганич. химия*, **1**, 437–446.

8. Anantharamaiah G. M., Sivanandaiah K. M. (1977) J. Chem. Soc. Perkin I, 490—491.
9. Wolman Y., Callop P. M., Patchornic A., Berger A. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 1889—1892.

Поступила в редакцию
28.II.1979

После доработки
4.V.1979

**SYNTHESIS OF HEXADECAPEPTIDE CORRESPONDING TO THE SEQUENCE
23-38 OF HORSE HEART CYTOCHROME *c***

VOL'SKAYA N. E., VASILIEVA G. A., AMELINA V. N.,
FILENKOVA N. V., EVSTIGNEEVA R. P.

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

The protected hexadecapeptide corresponding to the amino acid sequence 23-38 of horse heart cytochrome *c* was synthesized by classic peptide chemistry procedure in solution.
