



УДК 547.96.057

СИНТЕЗ ТЕТРАКОНТАПЕПТИДА – ГИПОТЕТИЧЕСКОГО ЭВОЛЮЦИОННОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

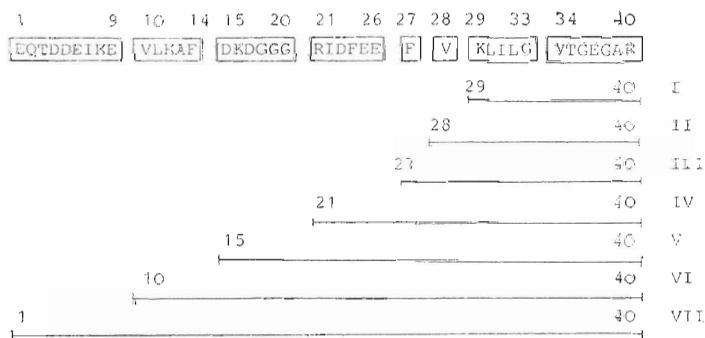
II*. КОНДЕНСАЦИЯ ФРАГМЕНТОВ

Юнг Р.**, Медведкин В. Н., Митин Ю. В.

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино, Московская обл.

Тетракоптапептид получен конденсацией синтезированных ранее фрагментов методом пентафторфениловых эфиров и с помощью карбодиимида с 1-гидроксибензотриазолом. Рацемизация при конденсации фрагментов составляет 1–2%. Деблокирование защищенного тетракоптапептида проведено обработкой трифторуксусной кислотой и фтористым водородом с тиоанализом. Полученный пептид очищался гель-хроматографией и ВЭЖХ.

В предыдущем сообщении был описан синтез фрагментов (1–9), (10–14), (15–20), (21–26), (29–33), (34–40) тетракоптапептида гипотетического эволюционного предшественника кальцийсвязывающих белков [1]. В настоящей статье дается описание конденсации полученных фрагментов, которая проводилась по схеме



Из использованных для получения 40-членного пептида шести фрагментов два в качестве С-концевого остатка имеют глицины (фрагменты (15–20) и (29–33)), два – глутаминовую кислоту (фрагменты (1–9) и (21–26)), а один (фрагмент (10–14)) – фенилаланин. Таким образом, главной проблемой при конденсации трех из пяти фрагментов была опасность рацемизации. Необходимо было выбрать такое конденсирующее средство и такие условия конденсации, чтобы реакция сопровождалась минимальной рацемизацией.

Поскольку как сами исходные фрагменты, так и продукты их конденсации плохо растворимы, в качестве растворителей мы были вынуждены использовать DMSO, NMPA, DMF и их смеси. Прежде чем проводить конденсацию, мы изучили влияние условий конденсации на оптическую

* Сообщение I см. [1].

** Адрес в настоящее время: Центральный институт генетики и исследований культурных растений, Гатерслебен, ГДР.

Сокращения: DMSO – диметилсульфоксид, DMF – диметилформамид, NMPA – гексаметиламин фосфорной кислоты, DCC – N,N'-дициклогексилкарбодиимид, HOBT – 1-гидроксибензотриазол, OHNSu – N-гидрокси-сукцинимид, TFA – трифторуксусная кислота, TEA – триэтиламин, ClZ – 2-хлорбензилкарбодиимид, Nps – 2-нитрофенилсульфенил.

Конденсация Z-Gly-Ala-OH (0,1 M) и H-Leu-OBu' (0,1 M)
10 мин при -20° C, 20 мин при 4° C, 90 мин при 20° C

Растворитель	Конденсирующий агент (концентрация, M)	[HOBT], M	Выход Z-Gly-Ala-Leu-OBu', %	Рацемизация, %
CHCl ₃	F-комплекс (0,12)	0	91	4,0
CHCl ₃		0,12	16	4,4
DMF		0	94	9,4
DMSO		0	73	9,6
Диметилацетамид		0	29	10,7
HMPA		0	9	4,4
DMF/HMPA (1:1)		0	61	13,0
	DCC (0,1)	0	62	37,0
		0,12	75	1,1
		0,2	79	0,6
		0,2 *	71	0,7
		0,2 **	83	0,7
	DCC (0,001)	0,0012	21	19,3 ***

* Вместо HOBT использовали HONSu.

** Вместо HOBT использовали N-гидрокси-5-нонборней-2,3-дикарбоксимид.

*** Карбоксильный и аминокислотный компоненты взяты в концентрации 0,001 M.

чистоту продукта на примере тестового трипептида Изумия Gly-Ala-Leu [2]. Основное внимание было уделено F-комплексу (1 моль DCC и 3 моль пентафторфенола) [3] и DCC с различными добавками [4], так как оба эти метода рекомендованы для конденсации пептидных фрагментов с минимальной опасностью рацемизации. Из полученных нами результатов (табл. 1) видно, что F-комплекс в наших условиях себя не оправдал и что наилучший результат дает DCC с добавкой HOBT.

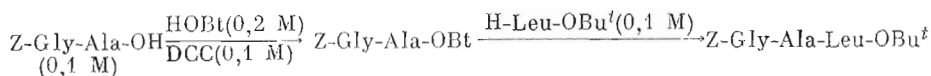
Из табл. 1 также следует, что увеличение количества HOBT дает лучшие результаты и что концентрация реагирующих компонентов имеет очень большое значение. В тех случаях, когда пептид плохо растворяется в выбранном растворителе, целесообразно подобрать другой растворитель, чтобы обеспечить максимальную концентрацию реагентов; разбавление раствора приводит к увеличению степени рацемизации. Аналогичное влияние концентрации реагентов на степень рацемизации было описано для случая использования в качестве добавки HONSu [5]. Для конденсации пептидных фрагментов мы выбрали метод, основанный на предварительной активации (преактивации) карбоксильного компонента с помощью DCC и HOBT. Поскольку в качестве карбоксильного компонента используются сравнительно легко растворимые пептиды, что позволяет работать с их высокими концентрациями, на стадии преактивации уменьшается опасность рацемизации.

Известно, что присутствие солей третичных аминов в реакционной среде увеличивает степень рацемизации даже при использовании в качестве добавки HOBT [6]. Мы также нашли, что при синтезе Z-Gly-Ala-Leu-OBu' присутствие в растворе лишь 0,5 экв. трифторацетата триэтиламина увеличивает степень рацемизации с 0,6 до 4,4%. Чтобы избежать нежелательного влияния солей триэтиламина, мы вводили в конденсацию свободные аминокислоты, которые получали обработкой соответствующих солей триэтиламина в DMF с последующим осаждением в эфир и промывкой метанолом и эфиром.

При анализе литературных данных можно сделать вывод, что при конденсации в среде HMPA получают обычно низкие выходы продуктов конденсации [7, 8]. Мы также нашли, что даже в тщательно очищенном HMPA выход пептида Z-Gly-Ala-Leu-OBu' падает с увеличением времени преактивации (табл. 2).

Аналогичное явление наблюдалось для пентафторфенилового эфира гексапептида (рис. 1). Из табл. 2 и рис. 1 можно сделать вывод, что,

Влияние времени преактивации на выход и степень рацемизации при реакции



Время преактивации в DMF/НМРА (1 : 4) *, ч	Выход Z-Gly-Ala-Leu -OBu ^t , %	Степень рацемизации, %
0,5	93	5,3
1,0	90	7,5
4,0	86	16,9
8,0	48	27,0
24,0	12	41,0

* Раствор 0,5 ммоль Z-Gly-Ala-OH, 1,0 ммоль HOBT и 0,5 ммоль DCC в 1 мл DMF выдерживали 10 мин при -20°С, 50 мин при 4°С, затем добавляли 4 мл НМРА и выдерживали при 20°С в течение указанного в таблице времени.

Таблица 3

Пептиды, полученные конденсацией фрагментов

Номер пептида	Последовательность	Пептид
I	29—40	Boc-Lys(CIZ)-Leu-Ile-Leu-Gly-Val-Thr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Ala-Arg(Tos)-OBzl
II	28—40	Boc-Val-Lys(CIZ)-Leu-Ile-Leu-Gly-Val-Thr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Ala-Arg(Tos)-OBzl
III	27—40	Boc-Phe-Val-Lys(CIZ)-Leu-Ile-Leu-Gly-Val-Thr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Ala-Arg(Tos)-OBzl
IV	21—40	Boc-Arg(Tos)-Ile-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Phe-Val-Lys(CIZ)-Leu-Ile-Leu-Gly-Val-Thr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Ala-Arg(Tos)-OBzl
V	15—40	Nps-Asp(OBzl)-Lys(Boc)-Asp(OBu ^t)-Gly-Gly-Gly-Arg(Tos)-Ile-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Phe-Val-Lys(CIZ)-Leu-Ile-Leu-Gly-Val-Thr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Ala-Arg(Tos)-OBzl
VI	10—40	Nps-Val-Leu-Lys(CIZ)-Ala-Phe-Asp(OBzl)-Lys(Boc)-Asp(OBu ^t)-Gly-Gly-Gly-Arg(Tos)-Ile-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Phe-Val-Lys(CIZ)-Leu-Ile-Leu-Gly-Val-Thr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Ala-Arg(Tos)-OBzl
VII	1—40	Boc-Glu(OBzl)-Gln-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile-Lys(CIZ)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Lys(CIZ)-Ala-Phe-Asp(OBzl)-Lys(Boc)-Asp(OBu ^t)-Gly-Gly-Gly-Arg(Tos)-Ile-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Phe-Val-Lys(CIZ)-Leu-Ile-Leu-Gly-Val-Thr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Ala-Arg(Tos)-OBzl

во-первых, преактивацию следует проводить не в НМРА, а в другом растворителе, например в DMF, во-вторых, процесс исчезновения активированного эфира протекает медленно по сравнению с аминолизом, поэтому следующую стадию — конденсацию с аминокислотой — можно проводить в НМРА. Руководствуясь полученными результатами, мы проводили соединение фрагментов следующим образом: преактивацию (DCC+HOBT) сравнительно легко растворимого карбоксильного компонента проводили в DMF при максимальной концентрации компонентов; полученный раствор активированного карбоксильного компонента добавляли к раствору аминокислоты в НМРА.

Контроль с помощью ТСХ за протеканием реакции конденсации трудно осуществить из-за применяемых растворителей (особенно DMSO и НМРА). В том случае, когда для конденсации использовали пентафторфениловые эфиры, контроль осуществлялся с помощью ИК-спектроскопии (карбонильная полоса сложноэфирной группы в районе 1820—1780 см⁻¹). Чувствительность метода достаточно высока, можно надежно определять концентрацию активированного эфира до 5·10⁻⁶ М, что в нашем случае соответствует более чем 99% превращения. Полнота конденсации во всех

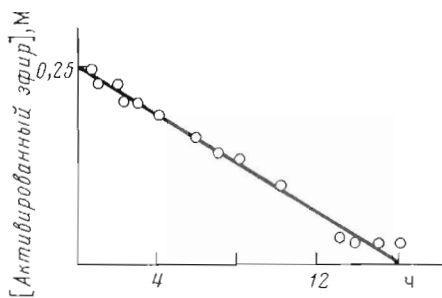


Рис. 1. Изменение концентрации пентафторфенилового эфира Nps-Asp (OBzl)-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Gly-Gly-Gly-OPfp в НМРА во времени при 30° С (измерено по полосе 1800 см⁻¹ на спектрофотометре Perkin-Elmer 180, США)

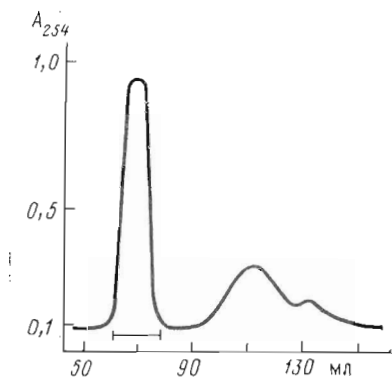


Рис. 2

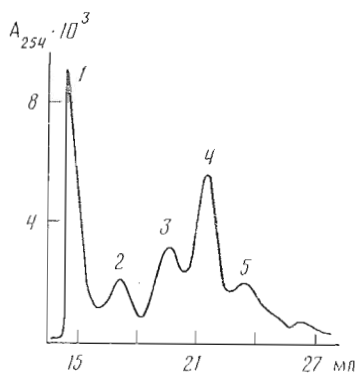


Рис. 3

Рис. 2. Гель-хроматография продукта деблокирования 91 мг тетракоптапептида (VII) на колонке (1,5×60 см) с сефадексом G-25 (сверхтонкий) в 0,05 М NH₄HCO₃, pH 8,0, скорость 10 мл/ч

Рис. 3. ВЭЖХ 20 мг тетракоптапептида на колонке (7,5×600 мм) Spherogel TSK 2000 SW в 0,05 М NH₄HCO₃, содержащей 1% CH₃COOH, pH 6,8, скорость 1 мл/мин

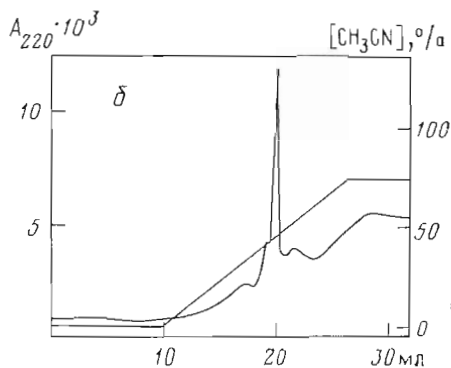
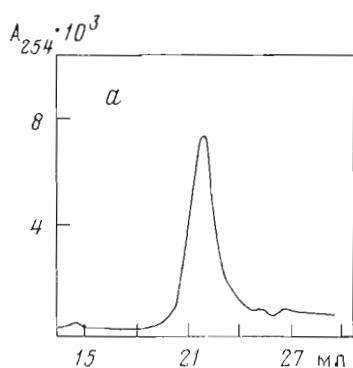


Рис. 4. Аналитическая ВЭЖХ тетракоптапептида: а – Spherogel TSK 2000 SW (7,5×600 мм), 0,05 М NH₄HCO₃, содержащий 1% CH₃COOH, pH 6,8, скорость 1 мл/мин; б – Ultrasil-octyl 10 мкм (4,5×250 мм), 0,01 М фосфат натрия, pH 6,7, при градиенте ацетонитрила от 0 до 75%, скорость 1 мл/мин

случаях с большой точностью определялась методом дансильирования α-аминогрупп. Этот метод обычно применяют для водорастворимых пептидов, однако мы нашли, что дансильирование можно с успехом вести в смеси хлороформ – трифторэтанол – ацетон – триэтиламин (2 : 1 : 0,3 : : 0,15) при 50° С. Этот метод позволяет определять содержание аминокомпонента с точностью до 0,01%, т.е. практически вплоть до количественного превращения. Для достижения количественного превращения аминокомпонента реакцию конденсации повторяли несколько раз. Дополнительный контроль за структурой получаемых пептидов давал аминокислотный анализ. Структура пептидов, полученных конденсацией фрагментов, представлена в табл. 3.

Растворимость защищенных пептидов в НМРА

Пептид	Число аминокислотных остатков	Растворимость, мкмоль/мл	Пептид	Число аминокислотных остатков	Растворимость, мкмоль/мл
I	12	500	V	26	40
III	14	90	VI	31	23
IV	20	20	VII	40	15

Интересно, что растворимость синтезируемых пептидов резко падает с ростом цепи от 10 до 20 аминокислотных остатков. Затем при дальнейшем удлинении цепи растворимость снова немного возрастает и далее опять уменьшается (табл. 4).

Как следует из схемы синтеза, фрагмент (27–40) был получен конденсацией фрагментов (29–33) и (34–40) с последующим присоединением валина-28 и фенилаланина-27. Это обусловлено тем, что синтезированный вначале фрагмент (27–33) оказался трудно растворимым, что затрудняло надежную конденсацию по схеме (27–33) + (34–40).

Конечный продукт — защищенный тетраконтапептид (VII) — был получен в количестве 0,730 г с выходом 23%, считая на исходный фрагмент (34–40). Низкая растворимость защищенного тетраконтапептида даже в НМРА не позволила применить какие-либо методы очистки, кроме переосаждения. Пептид (VII) был гомогенным по данным ТСХ в системе хлороформ — трифторэтанол — трифторуксусная кислота — гексафторбензол (7,5 : 3 : 0,6 : 4), результаты аминокислотного анализа были вполне удовлетворительны.

Деблокирование защищенного тетраконтапептида (VII) проводилось в два приема. Вначале обрабатывали трифторуксусной кислотой 30 мин при 0° С, затем HF с тиоанизолом 90 мин при 0° С. Длительное выдерживание с HF оказалось необходимым в силу того, что ClZ-группа удалялась гораздо труднее, чем Z-группа. Гель-хроматография продукта деблокирования проводилась на сефадексе G-25 (рис. 2). Затем пептид очищался с помощью ВЭЖХ на колонке Spherogel TSK 200 SW (рис. 3). Аминокислотный анализ полученного пептида соответствует его структуре. Для дополнительного подтверждения чистоты полученного тетраконтапептида были определены аминогруппы (метод дансильирования) и обнаружены только α -NH₂-группа глутаминовой кислоты и ϵ -NH₂-группы лизина. Было также осуществлено секвенирование пептида по Эдману, проведено 11 шагов, полученный результат соответствует ожидаемой структуре.

Поскольку при активировании фрагментов (1–9), (10–14) и (21–26) возможна рацемизация C-концевых аминокислот, мы провели газохроматографическое определение содержания D-изомеров в гидролизате тетраконтапептида, используя хиральную фазу на основе *n*-бутиламида L-валина [9]. При этом было найдено, что гидролизат содержит 6,6% D-Phe и 3,4% D-Glu. Однако следует отметить, что параллельное определение D-изомеров в гидролизате природного кальцийсвязывающего белка (парвальбумина карпа) дало 4,3% D-Phe и 3,1% D-Glu. Из этого следует, что частичная рацемизация происходит при кислотном гидролизе белка. Из полученных результатов можно сделать вывод, что рацемизация при конденсации фрагментов составляла 1–2%.

Экспериментальная часть

Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Durrum-D500 (США), удельное вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141A (США), газохроматографический анализ энантимеров аминокислот проводили на хроматографе Hewlett-Packard 5710A (США), секвенирование пептидов осуществляли на анализаторе Rank-Hilger APS-240 (твердофазный метод).

ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex 332 с колонкой Spherogel TSK 2000 SW и на хроматографе Varian-UV 254 с колонкой Ultrasil-octyl, ТСХ — на пластинках Silufol UV 254 (ЧССР) и Merck 60F254 (ФРГ) в следующих системах растворителей:

хлороформ – трифторэтанол – трифторуксусная кислота – гексафторбензол, 7,5 : 2,5 : 0,2 : 4 (А), 7,5 : 3 : 0,6 : 4 (В), 7,5 : 2,5 : 0,8 : 3 (В).

1. *Вос-Lys(CIz)-Leu-Ile-Leu-Gly-OPfp*. Раствор 6,50 г (8,8 ммоль) *Вос-Lys(CIz)-Leu-Ile-Leu-Gly-OH* (фрагмент (29–33) [1]) и 1,77 г (9,6 ммоль) пентафторфенола в 30 мл DMF охлаждали до -20°C и добавляли 1,98 г (9,6 ммоль) DCC. Смесь перемешивали 3 ч при 4°C , отфильтровывали $\text{N,N}'$ -дициклогексимочевину, фильтрат выдерживали 15 ч при -20°C , снова фильтровали и затем отгоняли DMF в вакууме. Продукт дважды пересаждали из диоксиана в эфир. Выход 7,2 г (92%), R_f 0,85 (А), $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 1806 cm^{-1} .

2. *Пептид (I)*. Растворили 2,43 г (2 ммоль) *Вос-Val-Thr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Ala-Arg(Tos)-OBzl* (фрагмент (34–40) [1]) в 10 мл TFA при 0°C , выдерживали 15 мин при 20°C , затем отгоняли TFA в вакууме, остаток обрабатывали эфиром. Полученный продукт растворяли в 10 мл DMF, добавляли 0,42 мл TEA, осаждали в эфир, осадок промывали метанолом, эфиром, сушили в вакууме, затем растворяли в 10 мл DMF и к полученному раствору добавляли 2,15 г (2,2 ммоль) *Вос-Lys(CIz)-Leu-Ile-Leu-Gly-OPfp*, 1 мл DMSO и 10 мл DMF. Через 30 мин в смесь добавляли 0,1 мл TEA, перемешивали еще 30 мин и выливали в 10% KHSO_4 , охлажденный до 0°C . Осадок дважды пересаждали из DMF в эфир и затем растворяли в горячей смеси этанол – вода (95 : 5). При охлаждении выпадал пептид. Операцию повторяли еще раз. Выход пептида (I) 2,82 г (74%), R_f 0,38 (А); $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ $-8,1^{\circ}$ (с 1, HMPA). Аминокислотный анализ: Thr 0,89 (1), Glu 0,99 (1), Gly 3,10 (3); Ala 1,02 (1), Val 1,02 (1), Leu 1,96 (2), Ile 0,98 (1), Lys 1,03 (1), Arg 1,01 (1).

3. *Пептид (II)*. Растворили 1,54 г (0,81 ммоль) соединения (I) в 10 мл TFA при 0°C , выдерживали 15 мин при 20°C , затем отгоняли TFA в вакууме, осадок обрабатывали эфиром. Полученный продукт растворяли в 10 мл смеси DMF – HMPA – DMSO (1 : 1 : 0,2), добавляли 0,17 мл (1,21 ммоль) TEA и осаждали в эфир. Осадок промывали эфиром, сушили и растворяли в 10 мл смеси DMF – HMPA – DMSO (1 : 1 : 0,2). К полученному раствору добавляли 0,31 г (0,81 ммоль) *Вос-Val-OPfp* [3], а через 30 мин еще 0,62 г (1,62 ммоль) *Вос-Val-OPfp* и 50 мкл TEA, перемешивали 8 ч и осаждали в смесь метанол – эфир (1 : 1). Осадок промывали метанолом и эфиром и затем дважды пересаждали из смеси DMF – HMPA – DMSO (1 : 1 : 0,2) в смесь метанол – эфир (1 : 1). Выход пептида (II) 1,52 г (94%), R_f 0,40 (А), $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ $-8,0^{\circ}$ (с 1, HMPA). Аминокислотный анализ: Thr 0,89 (1), Glu 0,98 (1), Gly 3,07 (3), Ala 1,05 (1), Val 2,06 (2), Leu 1,98 (2), Ile 0,98 (1), Lys 1,03 (1), Arg 1,01 (1).

4. *Пептид (III)*. Синтез проводили аналогично предыдущему, исходя из 3,41 г (1,7 ммоль) соединения (II) и 2,20 г (5,1 ммоль) *Вос-Phe-OPfp* [3] в 60 мл смеси DMF – HMPA – DMSO (1 : 1 : 0,2). Выход пептида (III) 3,49 г (95%), R_f 0,37 (А), $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ $-7,9^{\circ}$ (с 1, HMPA). Аминокислотный анализ: Thr 0,95 (1); Glu 1,02 (1), Gly 3,01 (3), Ala 1,01 (1), Val 2,03 (2), Leu 1,99 (2), Ile 0,99 (1), Phe 1,01 (1), Lys 1,02 (1), Arg 0,98 (1).

5. *Пептид (IV)*. а) Трифторацетат аминокомпонента, приготовленный из 0,487 г (0,255 ммоль) соединения (III), как описано для соединения (II), растворяли в 2,5 мл HMPA, добавляли 53 мкл (0,38 ммоль) TEA и осаждали в эфир. Осадок промывали последовательно метанолом, водой, метанолом и эфиром, сушили и растворяли в 2,5 мл HMPA (раствор А).

б) Растворили 0,450 г (0,338 ммоль) *Вос-Arg(Tos)-Ile-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OH* (фрагмент (21–26) [1]) и 0,230 г (1,690 ммоль) HOEt в 2,5 мл DMF, охлаждали до -20°C и к раствору добавляли 0,083 г (0,405 ммоль) DCC. Раствор выдерживали 30 мин при 4°C и затем его приливали к раствору А, охлажденному до 4°C . Через 1 ч реакционную смесь осаждали в эфир, осадок трижды промывали метанолом, потом эфиром и высушивали в вакууме. Для повторной конденсации использованы полученный осадок, а в реакцию преактивации брали 0,300 г (0,225 ммоль) гексапептида, 0,150 г (1,10 ммоль) HOEt и 0,055 г (0,270 ммоль) DCC в 2,5 мл DMF. В общей сложности конденсацию проводили 3 раза. Выход пептида (IV) 0,680 г (89%), R_f 0,39 (А), $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ $-7,0^{\circ}$ (с 1, HMPA). Аминокислотный анализ: Asp 1,01 (1), Thr 0,92 (1), Glu 3,10 (3); Ala 0,99 (1), Val 2,02 (2), Leu 1,98 (2), Gly 3,01 (3), Ile 1,99 (2), Phe 2,01 (2), Lys 0,99 (1), Arg 2,00 (2).

6. *Nps-Asp(OBzl)-Lys(Вос)-Asp(OBu')-Gly-Gly-Gly-OPfp*. Синтез проводили аналогично синтезу 1, исходя из 9,50 г (10 ммоль) *Nps-Asp(OBzl)-Lys(Вос)-Asp(OBu')-Gly-Gly-Gly-OH* (фрагмент (15–20) [1]), 2,21 г (12 ммоль) пентафторфенола и 2,47 г (12 ммоль) DCC. Продукт реакции дважды пересаждали из DMF в эфир. Выход пентафторфенилового эфира 9,16 г (82%), R_f 0,65 (А), $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ $-14,4^{\circ}$ (с 1, DMF).

7. *Пептид (V)*. Трифторацетат аминокомпонента, приготовленного из 0,673 г (0,2 ммоль) соединения (IV), как описано в синтезе 2, растворяли в 10 мл HMPA, добавляли 56 мкл (0,4 ммоль) TEA, осаждали в эфир, осадок трижды промывали метанолом, затем эфиром и сушили в вакууме. Полученный аминокомпонент растворяли в 10 мл HMPA и к раствору добавляли 0,223 г (0,2 ммоль) пентафторфенилового эфира, полученного в синтезе 6. Спустя 30 мин добавляли еще 10 мкл TEA и 0,111 г (0,1 ммоль) пентафторфенилового эфира, через 3 ч добавляли еще 0,111 г (0,1 ммоль) пентафторфенилового эфира и через 6 ч раствор выливали в эфир. Выпавший продукт трижды промывали метанолом, затем эфиром и сушили в вакууме. Выход пептида (V) 0,74 г (88%), R_f 0,27 (А), $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ $-2,0^{\circ}$ (с 1, HMPA). Аминокислотный анализ: Asp 2,85 (3), Thr 0,87 (1), Glu 3,09 (3), Gly 6,12 (6), Ala 1,02 (1), Val 2,07 (2), Leu 1,99 (2), Ile 1,98 (2), Phe 2,04 (2), Lys 1,99 (2), Arg 1,98 (2).

8. Пептид (VI). а) Аминокомпонент получали из 0,604 г (0,144 ммоль) соединения (V) и 0,28 г (3,6 ммоль) тиоанизола в 50 мл смеси хлороформ — трифторэтанол — уксусная кислота (2:1:1). Через 30 мин растворители удаляли в вакууме, остаток промывали последовательно эфиром, метанолом, водой, метанолом и эфиром. Полученный продукт растворяли в 6 мл НМРА, добавляли 30 мкл (0,217 ммоль) ТЕА, осаждали в эфир, осадок промывали метанолом, водой, метанолом, эфиром, сушили в вакууме.

б) Растворяли 0,185 г (0,206 ммоль) Nps-Val-Leu-Lys(ClZ)-Ala-Phe-OH (фрагмент (10—14) [1]) и 0,139 г (1,03 ммоль) НОВТ в 1 мл ДМФ, охлаждали до -20°C и добавляли 0,052 г (0,250 ммоль) ДСС. Далее поступали как описано в синтезе 5б. Для повторной конденсации (проводили 2 раза) брали 0,123 г (0,137 ммоль) Nps-пентапептида, 0,093 г (0,685 ммоль) НОВТ и 0,034 г (0,165 ммоль) ДСС. Осажденный в эфир продукт выдерживали 24 ч при -20°C , затем центрифугировали. Выход пептида (VI) 0,52 г (77%); R_f 0,26 (А), 0,37 (Б); $[\alpha]_D^{22} -9,5^{\circ}$ (с 1, НМРА). Аминокислотный анализ: Asp 3,03 (3), Thr 0,88 (1), Glu 3,06 (3), Gly 6,03 (6), Ala 2,03 (2), Val 2,97 (3), Leu 2,99 (3), Ile 1,98 (2), Phe 3,01 (3), Lys 2,99 (3), Arg 2,03 (2).

9. Пептид (VII). а) Аминокомпонент получали из соединения (VI) аналогично синтезу 8а; 0,200 г (41,6 мкмоль) аминокомпонента растворяли в 2,5 мл НМРА.

б) В реакцию преактивации брали 0,120 г (62 мкмоль) Boc-Glu(OBzl)-Gln-Thr-(Bzl)-Asp(OBzl)-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile-Lys(ClZ)-Glu(OBzl)-OH (фрагмент (1—9) [1]), 0,043 г (310 мкмоль) НОВТ и 0,016 г (75 мкмоль) ДСС в 0,8 мл ДМФ.

Конденсацию повторяли еще дважды, как описано в синтезе 5б, беря 0,080 г (42 мкмоль) нонапептида, 0,029 г (200 мкмоль) НОВТ и 0,010 г (50 мкмоль) ДСС. После обработки, указанной в синтезе 5б, продукт суспендировали в ДМФ, перемешивали при 40°C 1 ч, осаждали в метанол и центрифугировали. Осадок растворяли в смеси хлороформ — трифторэтанол (2:1), добавляли ДМФ, ушаривали в вакууме до состояния твердого геля, растворяли с метанолом, центрифугировали, осадок промывали метанолом и эфиром. Выход пептида (VII) 0,160 г (58%), R_f 0,25 (Б), $[\alpha]_D^{22} -8,0^{\circ}$ (с 1, НМРА). Аминокислотный анализ: Asp 4,91 (5), Thr 1,75 (2), Glx 7,10 (7), Gly 6,07 (6), Ala 2,02 (2), Val 3,04 (3), Leu 3,01 (3), Ile 3,02 (3), Phe 3,06 (3), Lys 4,05 (4), Arg 1,99 (2).

10. Деблокирование пептида (VII) и очистка тетракоптапептида. Растворяли 91 мг (13,7 мкмоль) соединения (VII) 1 мл ТФА, выдерживали 30 мин, отгоняли ТФА в вакууме, остаток растворяли с эфиром, отфильтровывали и затем обрабатывали 90 мин при 0°C 5 мл HF с 0,5 мл тиоанизола. HF удаляли в вакууме, остаток промывали эфиром, заливали 1 М NH_4HCO_3 и хлороформом и встряхивали до полного растворения осадка. Водную фазу отделяли, хроматографировали на колонке с сефадексом G-25 (рис. 2). После лиофилизации получали 57 мг (94%) пептида. Для дальнейшей очистки 20 мг пептида хроматографировали на колонке (7,5×600 мм) Spherogel TSK 2000 SW (рис. 3). После лиофилизации фракции 4 получили 7,1 г тетракоптапептида. По данным ВЭЖХ на Spherogel TSK 2000 SW, Ultrasil-AX (ионообменная хроматография), Ultrasil-ocyl (образцово-фазовая хроматография) (рис. 4) пептид достаточно чист и может быть использован для определения его основных свойств. Аминокислотный анализ: Asp 4,89 (5), Thr 1,71 (2), Glx 7,21 (7), Gly 6,09 (6), Ala 2,01 (2), Val 3,10 (3), Leu 2,98 (3), Ile 3,00 (3), Phe 2,97 (3), Lys 3,96 (4), Arg 2,01 (2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гречишко В. С., Медведкин В. Н., Запевалова Н. П., Юнг Р., Митин Ю. В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1465—1473.
2. Izumiya N., Muraoka M., Aoyagi H. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1971. V. 44. № 12. P. 3391—3395.
3. Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I. // Lieb. Ann. Chem. 1973. № 9. P. 1421—1429.
4. König W., Geiger R. // Chem. Ber. 1970. V. 103. № 3. P. 788—798.
5. Waki M., Minematsu J., Izumiya N. // Peptide Chemistry 1978. Osaka, 1979. P. 49.
6. Kitada C., Fujino M. // Chem. Pharm. Bull. 1978. V. 26. № 2. P. 585—590.
7. Волынина О. М., Дешко Т. Н., Михалева И. И., Иванов В. Т. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 8. С. 1155—1162.
8. Galpin I. G., Hancock F. E., Hand B. K., Jackson A. G., Kenner C. W., Ramage R., Singh B., Tyson R. G. // Tetrahedron. 1979. V. 35. № 23. P. 2779—2783.
9. Saeed J., Sandra P., Verzele M. // J. Chromatogr. 1979. V. 186. P. 611—618.

Поступила в редакцию 18.XI.1986

После доработки 2.IV.1987

SYNTHESIS OF A TETRACONTAPEPTIDE, HYPOTHETICAL ANCESTOR OF CALCIUM-BINDING PROTEIN.

II. CONDENSATION OF FRAGMENTS

JUNG R., MEDVEDKIN V. N., MITIN Yu. V.

Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino Moscow Region

A tetracontapeptide was obtained by condensation of synthetic fragments (see the preceding paper) with the use of pentafluorophenyl esters as well as with carbodiimide and hydroxybenzotriazole. Racemization during fragment condensation was 1—2 per cent. Deblocking of the protected tetracontapeptide was carried out by treatment with trifluoroacetic acid and hydrogen fluoride with thioanisole. The obtained peptide was purified by gel-chromatography and HPLC.