БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 6 * № 8 * 1980

УДК 547.962.07

ИССЛЕДОВАНИЕ ПО СИНТЕЗУ α-БУНГАРОТОКСИНА

III*. СИНТЕЗ ЗАЩИЩЕННОГО 74-ЧЛЕННОГО ПЕПТИДА С ПОЛНОЙ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ α-БУНГАРОТОКСИНА

Вольпина О. М., Дешко Т. Н., Михалева И. И., Иванов В. Т.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Описан синтез защищенного 74-членного полипептида, отвечающего полной аминокислотной последовательности α-бунгаротоксина. Проведен поиск оптимального пути сборки 74-членного пептида из фрагментов 1—19, 20—74, 1—37 и 38—74 α-бунгаротоксина. Методом КД-спектроскопии прослежена взаимосвязь между длиной защищенных пептидов, их растворимостью и особенностями их вторичной структуры.

В предыдущих статьях [1, 2] настоящей серии рассматривался синтез пептидных блоков, в сумме соответствующих полной аминокислотной последовательности α-бунгаротоксина, нейротоксина из яда змеи *Bungarus multicinctus*: 1—19, 20—37 и 38—74. В настоящей работе изучены пути сборки молекулы токсина из фрагментов и выбор оптимального из них с целью получения защищенного 74-членного пептида в препаративном масштабе.

В соответствии с набором синтезированных нами ранее защищенных пептидных блоков последовательности 1—19, 20—37 и 38—74 токсина представлялось целесообразным прежде всего оценить возможности двух вариантов синтеза пептида 1—74: по схеме (1—19)+[(20—37)+(38—74)], т. е. конденсацией N-концевого нонадекапептида и 55-членного пептида, полученного в свою очередь из С-концевой «половины» (38—74) и пептида (20—37), или по схеме [(1—19)+(20—37)]—(38—74), т. е. конденсацией пептидов, соответствующих N- и С-концевым «половинам» последовательности молекулы токсина. На схеме представлены оба варианта синтеза 74-членного полипептида последовательности α-бунгаротоксина.

55-членный пептид 20—74 (III) был получен с выходом 33% конденсацией октадекапептида 20—37 (II) и гептатриаконтапептида 38—74 (Ia) DCC/HOBT-методом в диметилформамиде. Следует отметить, что полученный продукт обладал более низкой растворимостью в диметилформамиде, чем остальные пептиды, полученные в настоящей работе; это свойство было использовано для удаления остатков непрореагировавших веществ. Чистоту выделенного 55-членного пептида (III) контролировали определением N-концевых аминокислот дансильным методом и данными аминокис-

* Сообщение I см. [1].

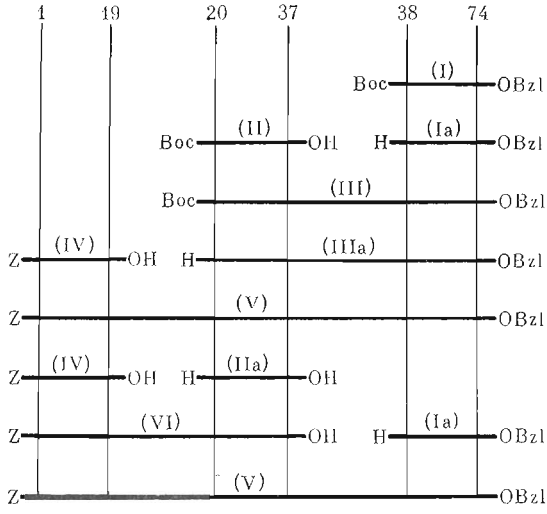


Схема синтеза защищенного полипептида с последовательностью α-бунгаротоксина

лотного анализа (таблица). Характеристика степени чистоты пептида (III) колоночной гель-хроматографией оказалась невозможной из-за низкой растворимости продукта в диметилформамиде.

Далее, после удаления N^{α}-Boc-защитной группы 55-членный пептид конденсировали с нонадекапептидом 1—19 (IV) DCC/HOBT-методом. Продукт реакции, 74-членный пептид (V), был выделен гель-хроматографией в диметилформамиде на смоле Bio-Beads S-X1 (рис. 1), используемой в настоящей работе для хроматографии пептидов, размер которых превышал предел эксклюзии сефадекса LH-20 в диметилформамиде (3000—4000). Выход пептида 1—74 составлял лишь 16%, причем даже после 3-кратной хроматографии не удалось добиться полного отделения исходного пептида 20—74 (IIIa) от конечного продукта (V).

Более удобным оказался второй вариант синтеза 74-членного пептида. N-Концевая «половина молекулы» токсина 1—37 (VI) была синтезирова-

Данные аминокислотного анализа синтезированных соединений

Аминокислота	20—74 (III)		1—37 (VI)		1—74 (V)			
	(20—37)+(38—74)		(1—19)+(20—37)		(20—74)+(1—19)		(1—37)+(38—74)	
	теория	найдено	теория	найдено	теория	найдено	теория	найдено
Asp	2+2	3,4	0+2	2,0	4+0	4,0	2+2	3,6
Thr	0+3	3,3	4+0	2,9	3+4	5,0	4+3	6,5
Ser	2+2	3,2	2+2	3,0	4+2	6,4	4+2	4,2
Glu	1+4	5,1	0+1	1,0	5+0	5,1	1+4	5,3
Pro	0+5	4,0	3+0	3,5	5+3	3,4	3+5	7,8
Gly	1+2	3,0	1+1	2,2	3+1	4,8	2+2	4,3
Ala	1+2	3,9	2+1	3,2	3+2	5,2	3+2	5,8
Cys	3+5	3,5	2+3	3,1	8+2	5,8	5+5	5,5
Val	0+3	3,0	2+0	1,8	3+2	3,7	2+3	5,5
Met	1+0	0,4	0+1	0,8	1+0	0,6	1+0	0,5
Ile	–	–	2+0	1,8	0+2	1,7	2+0	2,0
Leu	1+1	1,8	0+1	0,8	2+0	1,8	1+1	1,6
Tyr	1+1	0,4	0+1	0,6	2+0	1,4	1+1	1,3
Phe	1+0	1,0	0+1	1,0	1+0	0,7	1+0	1,0
His	0+1	0,9	1+0	0,9	1+1	1,2	1+1	1,2
Lys	1+5	6,1	0+1	1,1	6+0	5,5	1+5	5,5
Arg	2+1	2,7	0+2	2,0	3+0	2,1	1+2	1,7

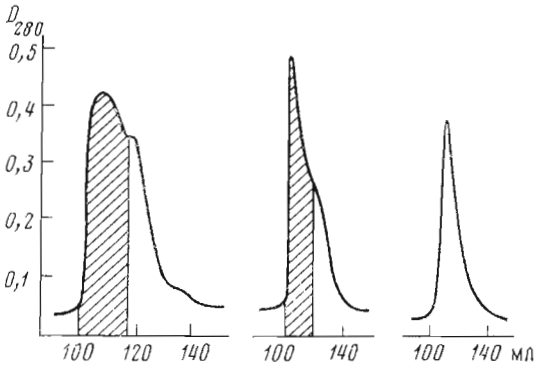
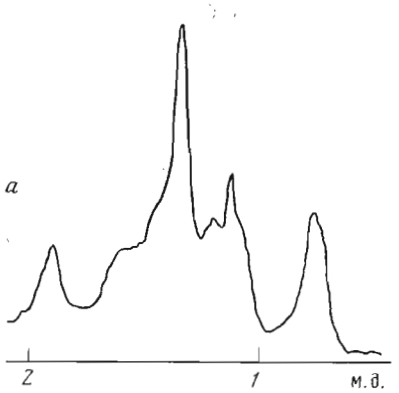


Рис. 1



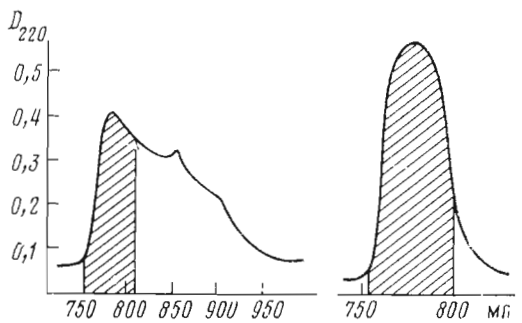


Рис. 3

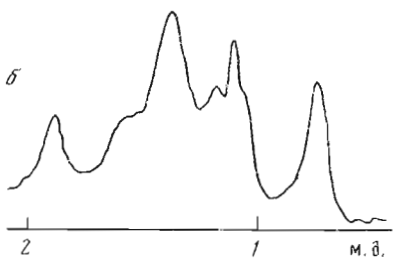


Рис. 2

Рис. 1. Хроматографическое выделение полипептида 1—74 (V), полученного по схеме (1—19)+(20—74), на колонке (24×760 мм) со смолой Bio-Beads S-X1 в диметилформамиде. Заштрихована область, соответствующая отбираемой фракции

Рис. 2. ПМР-спектры октадекапептида 20—37 в d_6-диметилсульфоксиде до (*а*) и после (*б*) обработки CF_3COOH, содержащей 1% меркаптоэтанола (*с* 10 мг/мл)

Рис. 3. Хроматографическое выделение полипептида 1—37 (VI) на колонке (55×1000 мм) со смолой Bio-Beads S-X1 в диметилформамиде. Заштрихована область, соответствующая отбираемой фракции

на DCC/HOBT-конденсацией нонадекапептида 1—19 (IV) и октадекапептида 20—37 (IIа), полученного удалением Boc-защитной группировки у производного (II) трифторуксусной кислотой в присутствии меркаптоэтанола (схема).

Известно, что ацидолитическое отщепление Boc-группировки сопряжено с опасностью *трет*-бутилирования индольного кольца триптофана [3,4], причем скорость и специфичность *трет*-бутилирования в высокой степени зависят от характера отщепляющих реагентов и окружения остатка триптофана в цепи [5]. Спектральные характеристики различных C- и C, N^{in}-*трет*-бутилированных производных триптофана подробно изучены в последнее время [6—9]. Установлено, что в спектрах ^{1}H-ЯМР этих производных синглетные сигналы 9 протонов *трет*-бутильной группы, внедренной в положения N^{in}, C^2, C^5 и C^7, имеют соответственно следующие значения химических сдвигов: 1,60; 1,44; 1,49 и 1,37 м.д. [7]. Чтобы оценить степень протекания этой побочной реакции при деблокировании октадекапептида (II), мы провели сравнительный анализ ПМР-спектров этого пептида до и после обработки трифторуксусной кислотой в присутствии 1% меркаптоэтанола. Из рис. 2 видно, что *трет*-бутилирование остатка триптофана в заметной степени не происходит, так как новые сигналы в области 1—2 м.д. в спектре соединения (IIа) отсутствуют.

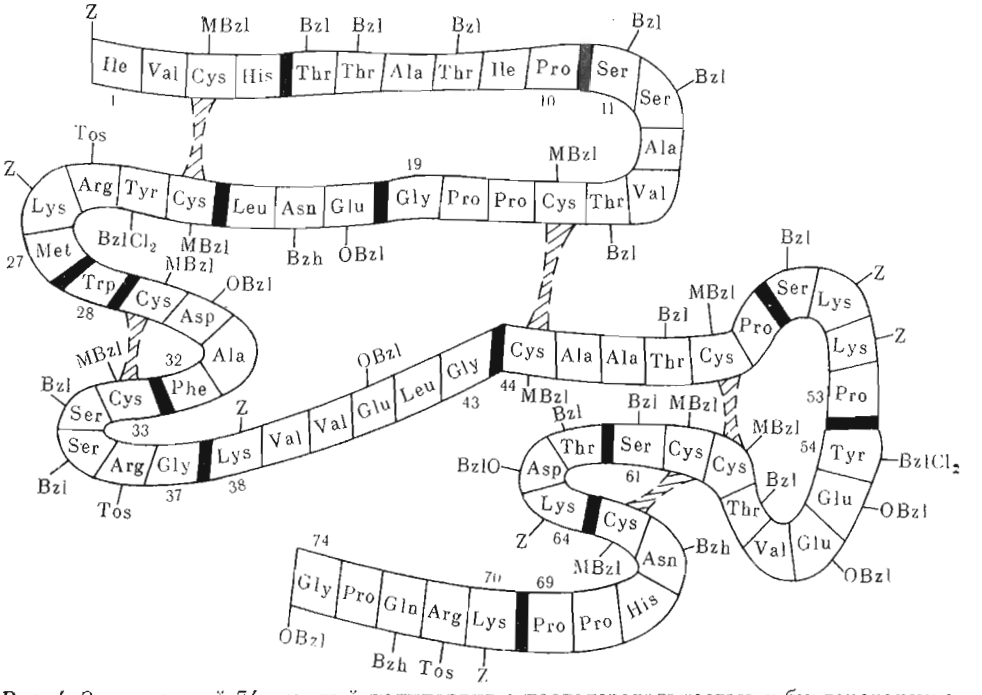


Рис. 4. Защищенный 74-членный полипептид с последовательностью α-бунгаротоксина

Защищенный 37-членный пептид (VI), соответствующий N-концевой «половине» последовательности α-бунгаротоксина, был очищен двукратной гель-фильтрацией на смоле Bio-Beads S-X1 в диметилформамиде (рис. 3) и выделен с выходом 42%. Данные аминокислотного анализа гептатриаконтапептида (VI) приведены в таблице.

Конденсацией эквимольных количеств пептидов 1—37 (VI) и 38—74 (Ia) DCC/HOBT-методом в диметилформамиде был получен соответствующий тетрагептаконтапептид 1—74 (V) с выходом 91%. Структура защищенного 74-членного пептида показана на рис. 4. Продукт реакции выделяли гель-хроматографией на смоле Bio-Beads S-X1 в диметилформамиде. Как видно из приведенной на рис. 5 кривой элюции, конечный продукт реакции легко отделялся от непрореагировавших исходных веществ. Таким образом, по схеме (1—37)+(38—74) был получен защищенный 74-членный полипептид с последовательностью α-бунгаротоксина в препаративных количествах (1 г). Полученный продукт после обработки HBr/CH_3COOH обнаруживал в качестве N-концевой только одну аминокислоту — изолейцин. Данные аминокислотного анализа приведены в таблице. Следует отметить, что при гидролизе в стандартных условиях достаточно длинных пептидов, имеющих многочисленные защитные группировки, для ряда аминокислот (Cys, Tyr, Ser, Thr, Met, Pro, Arg), по данным аминокислотного анализа, мы получали заниженные результаты, что связано с протеканием ряда побочных реакций в ходе гидролиза защищенных пептидов [1].

Учитывая сложности, связанные с гидролизом длинных защищенных пептидов, при обработке данных аминокислотного анализа пептидов (III), (VI) и (V) оказалось удобным проводить оценку «диагностических аминокислот», т. е. устойчивых в условиях кислотного гидролиза аминокислот, которые встречаются в одном из конденсируемых фрагментов и не встречаются в другом. Например, в пептиде 20—74 (III), синтезированном из фрагментов (20—37)+(38—74), найдено 3 остатка валина (который содержится только во фрагменте 38—74) и 1 остаток фенилаланина (содержится только в октадекапептиде 20—37) (см. таблицу).

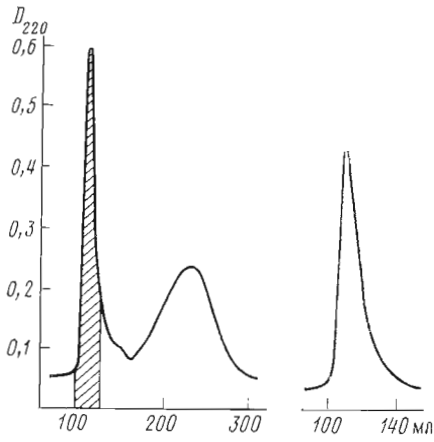


Рис. 5. Хроматографическое выделение полипептида 1—74 (V), синтезированного по схеме (1—37)+(38—74) на колонке (24×760 мм) со смолой Bio-Beads S-X1 в диметилформамиде. Заштрихована область, соответствующая отбираемой фракции

При выборе стратегии синтеза мы остановились на принципе использования максимального числа гидрофобных защитных групп, полагая, что их присутствие, с одной стороны, сведет к минимуму протекание побочных реакций при синтезе, а с другой — позволит сохранить достаточно высокую растворимость в органических средах. И действительно, в процессе синтеза нам почти не пришлось сталкиваться с трудностями, которые бы вызывала плохая растворимость фрагментов: за исключением фрагмента (20—74), все пептиды достаточно хорошо растворялись в диметилформамиде, что определило успех синтеза и очистки.

В связи с тем что в ходе синтеза защищенной последовательности α-бунгаротоксина нами был получен большой набор защищенных пептидов различной длины, представлялось интересным выяснить связь между длиной пептидов, их конформационными особенностями и растворимостью. С этой целью были исследованы КД-спектры С-концевых пептидов 65—74, 54—74, 44—74 и 38—74 (рис. 6), пептидов, отвечающих средним сегментам полной последовательности — 11—19, 20—28 и 44—53 (рис. 7), N-концевых пептидов 1—10 и 1—37, а также защищенного α-бунгаротоксина (рис. 8). Кроме того, при попытке растворения выявилась недостаточная растворимость 8—18-членных пептидов с последовательностями 20—37, 28—43, 29—37, 32—43, 54—61, 54—64.

Известно, что по мере увеличения длины олигопептида с монотонной последовательностью наблюдается тенденция к переходу от неупорядоченных конформаций у пептидов, состоящих из 2—5 аминокислот, к формам, содержащим β-изгибы, или к β-складчатым ассоциатам у пептидов, содержащих от 6 до 10 аминокислотных остатков; у более длинных пептидов усиливается тенденция к образованию α-спиральных структур [10—12].

Учитывая изложенное, мы объясняем низкую растворимость перечисленных выше пептидов их склонностью к ассоциации за счет образования β-структур. Растворимые пептиды 1—10, 38—74 и 1—74 не обнаруживают существенных изменений кривых КД в интервале концентраций 10^{-3}—10^{-5} М, что говорит об их низкой склонности к ассоциации. Общий вид приведенных на рис. 5—7 кривых КД, а именно слабые отрицательные n-π^*-эффекты Коттона при ~220 нм, более интенсивные отрицательные эффекты при 198—207 нм и положительные эффекты при ~190 нм указывают на доминирование неупорядоченных структур. Слабые признаки наличия α-спиральных участков (18%, считая по методу, приведенному в работе [13]) появляются лишь у пептида с максимальной длиной — защищенного α-бунгаротоксина. По-видимому, нерегулярная первичная структура исследованных пептидов препятствует образованию ими упорядочен-

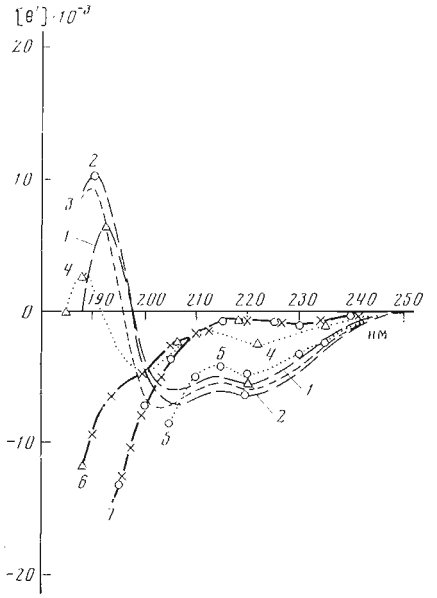


Рис. 6

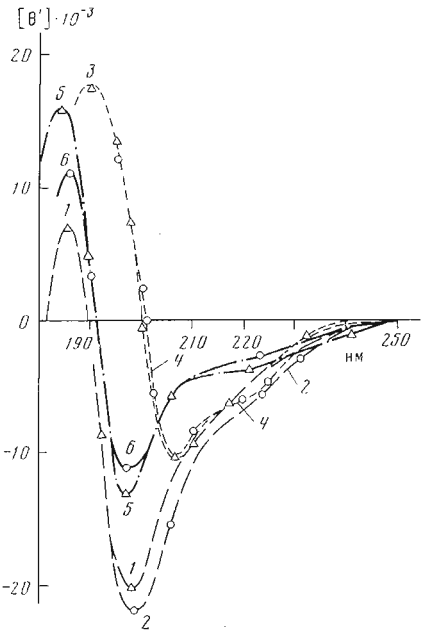


Рис. 7

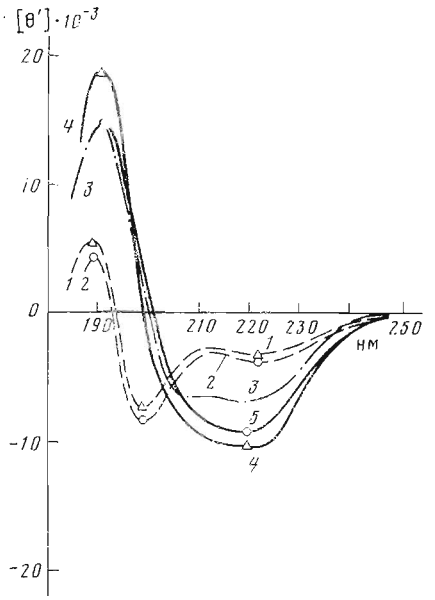


Рис. 8

Рис. 6. КД-спектры С-концевых фрагментов α-бунгаротоксина: 38—74 (*1* — *c* 3,34·10⁻⁵ М, *2* — *c* 1,05·10⁻³ М), 44—74 (*3* — *c* 2,35·10⁻⁵ М), 54—74 (*4* — *c* 2,91·10⁻⁵ М, *5* — *c* 0,94·10⁻³ М) и 65—74 (*6* — *c* 1,51·10⁻⁴ М, *7* — *c* 1,13·10⁻³ М)

Рис. 7. КД-спектры средних фрагментов α-бунгаротоксина 11—19 (*1* — *c* 1,04·10⁻⁴ М, *2* — *c* 1,22·10⁻³ М), 20—28 (*3* — *c* 0,88·10⁻⁴ М, *4* — *c* 1,15·10⁻⁴ М) и 44—53 (*5* — *c* 1,15·10⁻⁴ М, *6* — *c* 1,04·10⁻³ М)

Рис. 8. КД-спектры N-концевых фрагментов и защищенного α-бунгаротоксина: 1—10 (*1* — *c* 1,61·10⁻⁴ М, *2* — *c* 1,47·10⁻³ М), 1—37 (*3* — *c* 2,82·10⁻⁵ М) и 1—74 (*4* — *c* 3,49·10⁻⁵ М, *5* — *c* 0,83·10⁻⁴ М)

ных структур и служит одной из причин их относительно высокой растворимости.

Таким образом, в результате работы был в препаративных количествах получен наиболее длинный пептид, когда-либо синтезированный в растворе с использованием стратегии максимальной защиты боковых групп. Результаты его деблокирования и окисления с целью замыкания дисульфидных мостиков будут рассмотрены в последующем сообщении.

Экспериментальная часть

Основные материалы и методы, использованные в работе, описаны в сообщении [1]. Спектры кругового дихроизма сняты на приборе «Joan III» (Франция), в качестве растворителя использован спектрально чистый трифторэтанол, концентрация растворов составляла $1 \cdot 10^{-2}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ М. Были использованы кюветы с толщиной слоя 1; 0,1; 0,01 и 0,001 см.

ЯМР-спектры сняты на спектрометре Varian SC300 (США) в d_6-диметилсульфоксиде, в качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан.

С-Концевой пептид последовательности 20–74 (III). 100 мг (0,014 ммоль) гептатриаконтапептида (I) обрабатывали 45 мин 15 мл 50% CF_3COOH в CH_2Cl_2. Раствор упаривали, остаток многократно промывали эфиром и получали трифторацетат пептида (Ia) с выходом 98 мг (98%).

К раствору 63 мг (0,017 ммоль) октадекапептида (II) в 10 мл диметилформамида при 0° С прибавляли 3,5 мг (0,017 ммоль) DCC и 3 мг (0,022 ммоль) HOBT, а затем раствор 98 мг (0,0137 ммоль) трифторацетата аминокомпонента (Ia) и 0,0014 мл (0,0137 ммоль) N-метилморфолина в 20 мл диметилформамида. Реакционную массу перемешивали 2 ч при 0° С и 1 сут при 25° С, затем к раствору прибавляли 1 мг (0,005 ммоль) DCC и перемешивали еще 3 сут. Пептид осаждали водой, отфильтровывали и промывали на фильтре метанолом, диметилформамидом, метанолом и эфиром. Получен 55-членный пептид (III) с выходом 50 мг (33%), т. пл. >200° С (разл.).

N-Концевой пептид последовательности 1–37 (VI). 375 мг (0,1 ммоль) октадекапептида (II) растворяли в 20 мл CF_3COOH, содержащей 1% меркаптоэтанола, через 30 мин растворитель упаривали, остаток промывали эфиром и получали трифторацетат октадекапептида (IIa) с выходом 358 мг (95%). 277 мг (0,1 ммоль) нонадекапептида (IV) растворяли в 15 мл диметилформамида, охлаждали до 0° С и добавляли 15 мг (0,11 ммоль) HOBT и 20,6 мг (0,10 ммоль) DCC. Реакционную массу перемешивали 1 ч при 0° С и 2 ч при 20° С, затем приливали смесь 358 мг (0,096 ммоль) пептида (IIa) и 0,021 мл (0,19 ммоль) N-метилморфолина в 23 мл диметилформамида. Раствор выдерживали 2 сут, нейтрализовали уксусной кислотой и приливали эфир. Осадок отфильтровывали, промывали метанолом и двукратной хроматографией на колонке (55×1000 мм) со смолой Bio-Beads S-X1 в диметилформамиде выделяли пептид (VI) (рис. 3). Выход 270 мг (42%), т.пл. >260° С (разл.), $[\alpha]_D^{20}$ −64,9° (*с* 0,7; CF_3CH_2OH).

Защищенный пептид последовательности 1–74 (V) (рис. 4). I. *а*) 40 мг (3,7 мкмоль) пептида (III) растворяли в 20 мл CF_3COOH, содержащей 1% меркаптоэтанола, через 15 мин растворитель упаривали, остаток многократно промывали эфиром и выделяли трифторацетат пептида (IIIa) с выходом 38 мг (95%). *б*) 13 мг (4,8 мкмоль) нонадекапептида (IV) растворяли в смеси 7 мл диметилформамида и 5 мл гексаметапола, охлаждали до 0° С и прибавляли 0,99 мг (4,8 мкмоль) DCC, 0,85 мг (6,25 мкмоль) HOBT, 38 мг (3,5 мкмоль) трифторацетата аминокомпонента (IIIa) и 0,39 мкл (3,5 мкмоль) N-метилморфолина. Реакционную массу перемешивали 2 ч при 0° С и 1 сут при 25° С, затем прибавляли 0,3 мг (1,45 мкмоль) DCC и перемешивали еще 3 сут. Пептид осаждали водой, отфильтровывали, промывали метанолом, эфиром и трехкратной хроматографией на колонке (24×760 мм) со смолой Bio-Beads S-X1 в диметилформамиде (рис. 1) выделяли защищенный α-бунгаротоксин (V). Выход 8 мг (16%).

II. 64 мг (0,01 ммоль) гептатриаконтапептида (VI) растворяли в 30 мл диметилсульфоксида, охлаждали до 0° С и прибавляли 2,06 мг (0,01 ммоль) DCC, 2 мг (0,015 ммоль) HOBT и 80 мг (0,011 ммоль) трифторацетата аминокомпонента (Ia) с 1,2 мкл (0,011 ммоль) N-метилморфолина. Реакционную массу перемешивали 2 ч при 0° С и 1 сут при 25° С, затем прибавляли 1,03 мг (0,005 ммоль) DCC и перемешивали еще 3 сут. К реакционной сме-

си приливали воду, полученный осадок отфильтровывали, промывали на фильтре метанолом и растворяли в диметилформамиде, нерастворимый остаток отфильтровывали. К раствору приливали воду, выпавший осадок отфильтровывали и промывали метанолом и эфиром. Полученный пептид очищали двукратной хроматографией на колонке (24×760 мм) со смолой Bio-Beads S-X1 в диметилформамиде (рис. 5). Получали защищенный α-бунгаротоксин с выходом 124 мг (91%), т.пл. >295°C (разл.), $[\alpha]_D^{20}$ −36,6° (*c* 1,4; CF_3CH_2OH).

ЛИТЕРАТУРА

1. Михалева И. И., Мягкова М. А., Жукова Г. Ф., Иванов В. Т. (1980) Биоорган. химия, **6**, 982–1007.
2. Вольпина О. М., Дейгин В. И., Михалева И. И., Иванов В. Т. (1980) Биоорган. химия, **6**, 1133–1154.
3. Alakhov Y. B., Kiryushkin A. A., Lipkin V. M. (1970) Chem. Communs, 406–407.
4. Jaeger E., Knof S., Schmidt I., Thamm P., Wünsch E. (1976) Abstracts of USSR–FRG Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins, pp. 4–6.
5. Löw M., Kisfaludy L., Sohar P. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **359**, 1643–1651.
6. Jaeger E., Thamm P., Knof S., Wünsch E. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **359**, 1617–1628.
7. Jaeger E., Thamm P., Knof S., Wünsch E. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **359**, 1629–1636.
8. Löw M., Kisfaludy L. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **359**, 1637–1642.
9. Chino N., Masui Y., Sakakibara S. (1977) in: Peptide Chemistry 1977 (Shiba T., ed.), p. 27, Protein Research Foundation.
10. Varon A., Katchalski E., Berger A., Fasman G. D. (1971) Biopolymers, **10**, 1107–1120.
11. Toniolo C. (1971) Biopolymers, **10**, 1707–1717.
12. Goodman M., Naider F., Toniolo C. (1971) Biopolymers, **10**, 1719–1730.
13. Greenfield N., Fasman G. D. (1969) Biochemistry, **8**, 4108–4116.

Поступила в редакцию
26.XII.1979

SYNTHETIC STUDY OF α-BUNGAROTOXIN. III. SYNTHESIS OF THE PROTECTED 74-MEMBERED PEPTIDE WITH ENTIRE AMINO ACID SEQUENCE OF α-BUNGAROTOXIN

VOL'PINA O. M., DESHKO T. N., MIKHALEVA I. I., IVANOV V. T.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The synthesis of the protected 74-membered polypeptide with the entire amino acid sequence of α-bungarotoxin was described. The optimal route for assembling this peptide from the fragments 1-19, 20-74, 1-37 and 38-74 was found. The peculiarities of the secondary structure of the protected peptides were correlated with their length and solubility using CD-spectroscopy.