



УДК 547.962.07

ИССЛЕДОВАНИЕ ПО СИНТЕЗУ α -БУНГАРОТОКСИНАIV. ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ НЕЙРОТОКСИНА I (*NAJA NAJA OXIANA*) И α -БУНГАРОТОКСИНА К ДЕЙСТВИЮ ЖИДКОГО ФТОРИСТОГО ВОДОРОДА. ДЕБЛОКИРОВАНИЕ ЗАЩИЩЕННОГО 74-ЧЛЕННОГО ПОЛИПЕПТИДА С АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ α -БУНГАРОТОКСИНА*Михалева Н. И., Вольпина О. М., Уткин Ю. Н.,
Иванов В. Т.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Осуществлено реокисление природного α -бунгаротоксина с выходом активного продукта 19%. Показана относительная устойчивость нативного нейротоксина I (НТ-I) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* к действию жидкого HF и лабильность НТ с разомкнутыми дисульфидными связями к аналогичной обработке (необратимое снижение числа SH-групп, образование полимерных продуктов, отсутствие активности у продукта реокисления). В ходе поиска защитных реагентов, ограничивающих деструкцию при обработке HF, найдены условия регенерации НТ-I и α -бунгаротоксина с полной биологической активностью с выходом 4–6% после проведения восстановления, обработки HF и окисления. В результате деблокирования защищенного 74-членного пептида с последовательностью α -бунгаротоксина HF в присутствии HgF_2 и последующего окисления с выходом 0,5% получен продукт, совпадающий с природным α -бунгаротоксином по данным аминокислотного анализа, определения N-концевой аминокислоты и по хроматографическому поведению на колонках с сефадексом G-50 и CM-целлюлозой, однако отличающийся от природного образца по УФ-спектру, спектру КД и не обладающий биологической активностью α -бунгаротоксина. Анализируются итоги исследования по синтезу α -бунгаротоксина.

В предыдущих сообщениях [1–3] описан синтез 74-членного защищенного полипептида, отвечающего полной аминокислотной последовательности α -бунгаротоксина — нейротоксина из яда тайваньской змеи *Bungarus multicinctus*. Заключительные этапы получения синтетического α -бунгаротоксина включали в себя удаление защитных групп и окислительное образование системы пяти дисульфидных связей. Отработка этих стадий является предметом данного сообщения.

Планируя проведение окислительного замыкания дисульфидных мостиков деблокированного 74-членного полипептида, мы основывались на успешных результатах Янга по реокислению кобротоксина [4] (количественный выход). Однако α -бунгаротоксин принадлежит к классу «длинных» токсинов. Полипептидная цепь этих токсинов длиннее цепи «коротких» токсинов, к которым относится кобротоксин, на 9–13 аминокислотных остатков и содержит дополнительный дисульфидный мостик. Как выяснилось в ходе исследования нейротоксинов из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* [5], эти две группы токсинов существенно различаются по своей способности к реокислению, причем в случае «длинных»

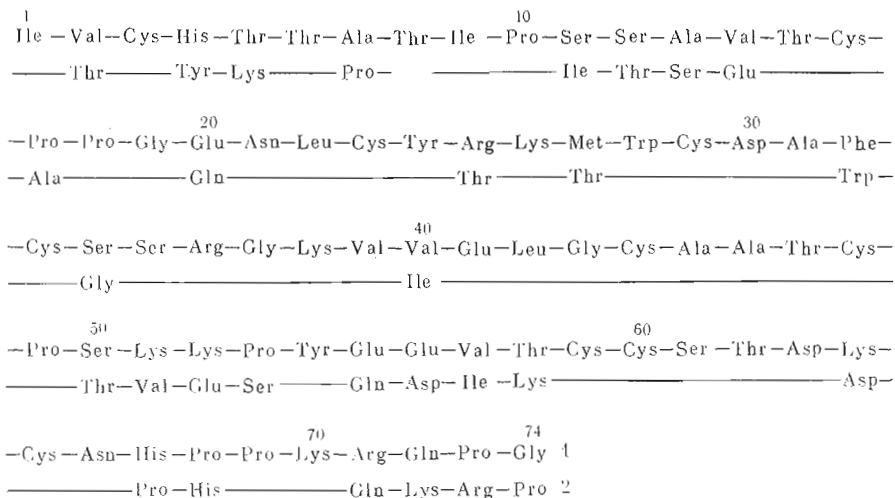


Рис. 1

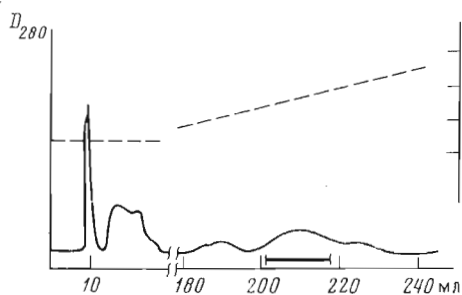


Рис. 2

Рис. 1. Аминокислотная последовательность α -бунгаротоксина (1) и нейротоксина I (2)

Рис. 2. Хроматографическое выделение реокисленного α -бунгаротоксина на колонке (1×9 см) с СМ-целлюлозой (СМ-32); градиент NH_4OAc -буфера от 0,05 М, рН 4,74 (0,5 л) до 0,5 М, рН 6,3. Здесь и далее отрезок прямой под кривой элюции соответствует отобранной фракции

токсина эта способность ниже. Установлено, что с наименьшей скоростью среди нейротоксинов яда среднеазиатской кобры проходит реокисление «длинного» нейротоксина I (НТ-I) (выходы 0% в условиях Янга и 10% в специально подобранных условиях) [5]. В исследованиях по синтезу α -бунгаротоксина мы часто использовали в качестве модельного природного токсина более доступный нейротоксин I, который содержит 73 аминокислотных остатка. Его аминокислотная последовательность в значительной степени гомологична последовательности α -бунгаротоксина (рис. 1). Мы реокислили природный α -бунгаротоксин в условиях, близких к условиям реокисления НТ-I, и ионообменной хроматографией с выходом 19% (рис. 2) выделили продукт, совпадающий с нативным токсином по хроматографическому поведению на СМ-целлюлозе, КД-спектру и токсичности. Таким образом были отработаны условия окислительного замыкания дисульфидных связей в синтетическом продукте.

Примененный нами набор защитных групп однозначно предопределил использование для полного деблокирования защищенного 74-членного пептида жидкого HF [6]. Прежде чем приступить к осуществлению этой стадии, мы показали, что НТ-I относительно устойчив к действию этого реагента: обработка его в стандартных условиях привела к исходному веществу с выходом 50%.

Основываясь на этих данных, мы приступили к деблокированию синтетического защищенного полипептида, однако обработка жидким HF и последующее окисление привели к неактивному препарату. Хроматографический анализ смеси, полученной после обработки HF, показал наличие фракции полимерного материала и значительно меньшей фракции с нуж-

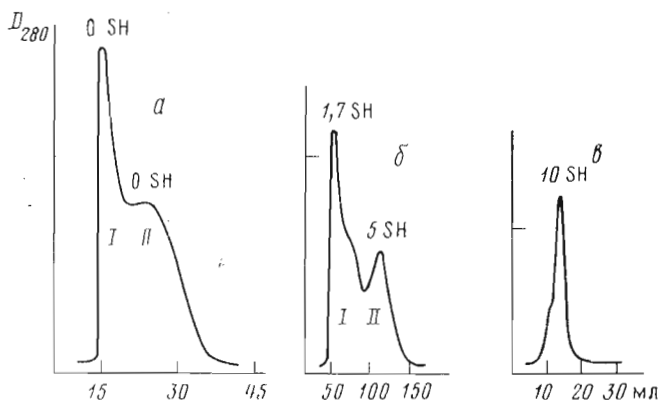


Рис. 3. Хроматографическое поведение синтетического полипептида с аминокислотной последовательностью α -бунгаротоксина, обработанного HF, на сефадексе G-50 (1,5×90 см) в 0,05 М NH_4OAc (pH 5), содержащем 6 М мочевины и 1% меркаптоэтанола (а); НТ-1в, обработанного HF, на биогеле Р-6 (1×47 см) в 0,1 н. AcOH (б); НТ-1в, обработанного HF в присутствии HgF_2 , на сефадексе G-50 (1×35 см) в 0,05 н. NH_4OAc , pH 5 (в). Для фракций, соответствующих полученным пикам, указано содержание SH-групп

пым молекулярным весом (рис. 3а). Обе фракции не содержали SH-групп и имели искаженный по сравнению с природным восстановленным α -бунгаротоксином УФ-спектр (рис. 4). Полимерную фракцию восстановлением тиолами не удалось превратить в продукт с молекулярным весом природного токсина и при этом не наблюдалось появления SH-групп.

Этот опыт по деблокированию синтетического полипептида свидетельствует о необходимости более детального изучения поведения токсинов в условиях обработки жидким HF. Моделируя условия удаления защитных групп с синтетического пептида, мы обработали HF нейротоксин I с восстановленными дисульфидными связями (НТ-1в). В результате этой обработки была получена сложная смесь продуктов (рис. 3б), которая, как и в опыте с синтетическим препаратом, содержала значительное количество полимерной фракции, причем и высокомолекулярная фракция, и фракция с нужным молекулярным весом характеризовались низким содержанием SH-групп. Аналогично опыту с синтетическим полипептидом полимеризация была необратимой и повторное восстановление не привело ни к мономерному продукту, ни к повышению содержания SH-групп. Обработанный HF образец НТ-1в обладал повышенным поглощением при 250—270 нм (рис. 5, в), а после реокисления в оптимальных для необработанного HF образца НТ-1в условиях [5] был выделен неактивный продукт.

Ввиду обнаруженных явлений лабильности НТ-1в в процессе обработки жидким HF нами был осуществлен поиск защитных реагентов, в присутствии которых НТ-1 с восстановленными дисульфидными мостиками не претерпевал бы заметных изменений в УФ-спектре и в содержании SH-групп. Изучались действия тиольных реагентов — меркаптоэтанола, этандитиола, тиогликолевой кислоты, цистеина, дитиотрепта, а также фторида двухвалентной ртути (табл. 1, рис. 5). Наиболее подходящим в ряду тиольных добавок оказался меркаптоэтанол, однако УФ-спектр полученного образца несколько отличался от спектра природного токсина (рис. 5, в), количество цистеиновой кислоты (после окисления продукта надмуравьиной кислотой и кислотного гидролиза) в данных его аминокислотного анализа было занижено по сравнению с теоретическим (табл. 2), а его реокисление привело к продукту с 60% активности (табл. 1). Наилучшие результаты достигнуты в опыте с добавкой фторида

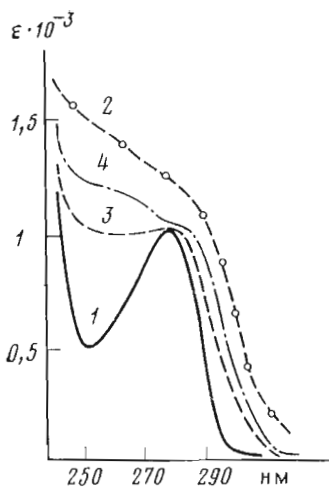


Рис. 4

Рис. 4. УФ-спектры в 0,1 н. АсОН природного α -бунгаротоксина (1); синтетического полипептида, обработанного HF (2); природного α -бунгаротоксина после восстановления, обработки HF в присутствии HgF_2 и реокисления (3); синтетического полипептида, обработанного HF в присутствии HgF_2 и окисленного (4)

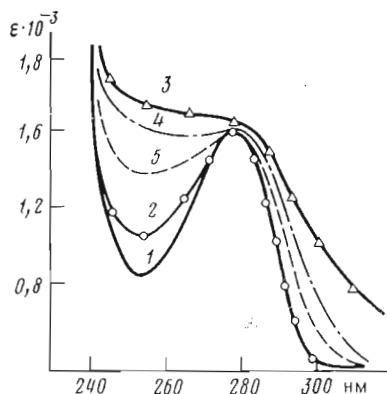


Рис. 5

Рис. 5. УФ-спектры в 0,1 н. АсОН НТ-IV (1); природного НТ-I, а также НТ-IV, обработанного HF+ HgF_2 , а затем реокисленного (2); НТ-IV, обработанного HF без добавок или с добавкой этилдитиола либо тиогликолевой кислоты (3); НТ-IV, обработанного HF+Cuys либо HF+Met (4); обработанного HF + меркаптоэтанол (5)

ртути. УФ-спектр полученного таким образом препарата был идентичен спектру природного токсина (рис. 5, 2); по хроматографическому поведению (рис. 3в) и по данным аминокислотного анализа (табл. 2) препарат был близок к исходному образцу. После реокисления восстановленного НТ-I, обработанного HF+ HgF_2 , и его выделения на колонке с СМ-целлюлозой (рис. 6) получен полностью активный продукт с выходом 6%. Аналогичная обработка (HF+ HgF_2) восстановленного природного α -бунгаротоксина и последующее его реокисление привели к 4% выходу продукта с полной биологической активностью (рис. 6, табл. 2). Таким образом, были найдены условия, ограничивающие деструкцию восстановленного α -бунгаротоксина под действием HF.

Обработка в этих условиях синтетического защищенного полипептида с последовательностью α -бунгаротоксина привела к 50—70% выходу белковой фракции с содержанием SH-групп, близким к теоретическому. После окисления с выходом 0,5% был получен продукт, аминокислотный анализ которого был близок к данным для природного α -бунгаротоксина (табл. 2). При определении N-концевой аминокислоты методом анализа дансильных производных была получена одна ожидаемая аминокислота — изолейцин. Продукт не отличался по хроматографическому поведению на колонках с сефадексом G-50 и СМ-целлюлозой от природного образца (рис. 7, 8, ср. рис. 2), однако отличался от него по УФ-спектру (рис. 4, 4) и по спектру КД (рис. 9). Выделенная фракция (рис. 7) не вызывала гибели животных даже при дозах в 5 раз выше, чем LD_{50} природного токсина. Так как максимально возможное содержание α -бунгаротоксина в полученной смеси было слишком мало, дальнейшая очистка не имела смысла.

Чтобы выяснить возможные причины отмеченных трудностей, более детально изучалась стадия удаления защитных групп на примере фрагмента защищенного 74-членного пептида — защищенного декапептида

Таблица 1

Результаты обработки НТ-IV жидким HF в присутствии различных защитных реагентов

Защитный реагент (экв.)	Выход продукта после обработки HF, %	Содержание SH-групп /моль	УФ-спектр *	Выход токсина после реокисления, %
—	30	3	Б	0
HOCH ₂ CH ₂ SH (300)	30	8	Б	6 (60% активности)
SHCH ₂ CH ₂ SH (100)	10	4	Б	—
SHCH ₂ COOH (100)	15	6	Б	—
Cys (100)	70	10	Б	—
Дитиотреит (100)	0	—	—	—
HgF ₂ (1,5)	90	10	А	6
Met (100)	30	9	Б	—

* А — УФ-спектр токсина остался неизменным, Б — УФ-спектр искажен по сравнению со спектром природного препарата

Таблица 2

Данные аминокислотных анализов НТ-I, α-бунгаротоксина и синтетического полипептида с последовательностью α-бунгаротоксина после обработки HF

Аминокислота	НТ-IV *			α-бунгаротоксин		
	теория	обработанный HF+HOCH ₂ CH ₂ SH	обработанный HF+HgF ₂	теория	восстановленный, обработанный HF+HgF ₂ и реокисленный	синтетический полипептид, обработанный HF+HgF ₂ и окисленный
CysSO ₃ H	10	5,4	9,5	—	—	—
Asp	6	5,8	6,0	4	3,7	3,8
Thr	10	5,4	7,0	7	5,3	5,3
Ser	4	3,3	3,2	6	4,1	3,6
Glu	6	6,0	6,5	5	4,2	5,2
Pro	6	6,0	6,6	8	7,2	8
Gly	4	5,1	5,0	4	5,5	4,1
Ala	4	4	4,3	5	5,4	6,1
Cys	—	—	—	10	5,5	5,6
Val	2	2	2,3	5	4,5	4,8
Met	—	—	—	1	0,6	0,6
Ile	5	4,3	5,0	2	1,3	1,4
Leu	2	2,4	2,5	2	1,3	1,6
Tyr	3	1,8	2,0	2	0,4	0,7
His	1	0,8	0,7	2	1,5	2,0
Phe	—	—	—	1	1,1	1,0
Lys	6	5,2	6	6	6,0	6,5
Arg	2	2	2,3	3	2,2	2,6

* Гидролиз НТ-I проведен после окисления надмуравьиной кислотой.

последовательности 1—10 Z-Ile-Val-Cys(MBzl)-His-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Ala-Thr(Bzl)-Ile-Pro-OH *, однородность которого в защищенном виде помимо ТСХ и аминокислотного анализа была проконтролирована данными высокоэффективной гель-хроматографии на сефадексе LH-20 в ДМФА. Деблокированный жидким HF в присутствии HgF₂ декапептид карбоксиметилировали и анализировали на колонке с ДЕАЕ-сефадексом А-25. Были выделены две фракции (рис. 10). Фракция II (выход 60%), по данным аминокислотного анализа (табл. 3), определения аминокислотной

* MBzl — *n*-метоксибензил.

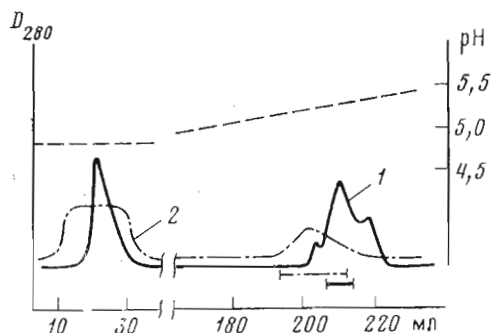


Рис. 6. Хроматографическое выделение НТ-I (1) и α -бунгаротоксина (2), обработанных после размыкания дисульфидных связей $\text{HF} + \text{HgF}_2$ и реокисленных. Колонка (1×9 см) с СМ-целлюлозой (СМ-32); элюирование в градиенте аммоний-ацетатного буфера от 0,05 М, рН 4,74 (0,5 л) до 0,5 М, рН 6,3; скорость элюции 18 мл/ч

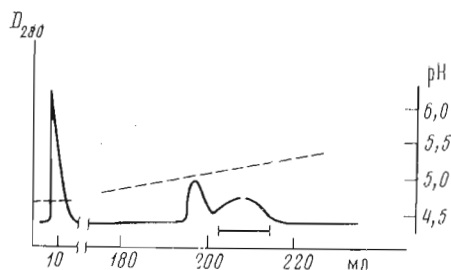


Рис. 7. Хроматографическое выделение на колонке (1×10 см) с СМ-целлюлозой (СМ-32) синтетического продукта после деблокирования ($\text{HF} + \text{HgF}_2$) и окисления. Градиент аммоний-ацетатного буфера от 0,05 М, рН 4,70 (0,5 л) до 0,5 М, рН 6,2

последовательности «ручным» методом дансил-Эдмана (4 шага) и по данным УФ-спектра (ϵ_{250} 500, ϵ_{280} 250), соответствовала ожидаемому декапептиду, в то время как в гидролизате фракции I (выход 10%) отсутствовал карбоксиметилцистеин и при определении аминокислотной последовательности не было обнаружено ожидаемого дансильного производного карбоксиметилцистеина. Фракция I имела завышенную по сравнению с немодифицированным декапептидом экстинкцию в области 240—280 нм (ϵ_{250} 3500, ϵ_{280} 2300).

Данные этого опыта свидетельствуют о протекании в жидком HF глубокой модификации или деструкции остатка цистеина, несмотря на присутствие в реакционной смеси защитного реагента HgF_2 . Аналогичные процессы должны, очевидно, протекать при обработке фтористым водородом защищенного полипептида с аминокислотной последовательностью α -бунгаротоксина по всем 10 остаткам цистеина.

Нами была предпринята попытка использовать деблокирующие реагенты, менее агрессивные, чем жидкий фтористый водород. Обработка 10% пиридином в жидком HF [7] не приводит, по-видимому, к полному удалению всех защитных групп, поскольку в результате реакции полностью отсутствует водорастворимая фракция. При попытке деблокирования синтетического полипептида другим реагентом, трис-трифторацетатом бора [8] с 10% тианизолом, образовалось вещество, содержащее 30% ожидаемых SH-групп и имеющее такой же УФ-спектр, как и продукт обработки $\text{HF} + \text{HgF}_2$.

Анализируя итоги выполненной работы, следует отметить, что основным препятствием, вставшим на пути синтеза, явились осложнения, свя-

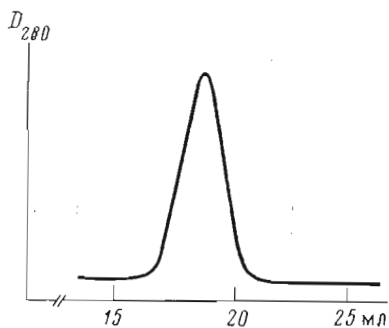


Рис. 8

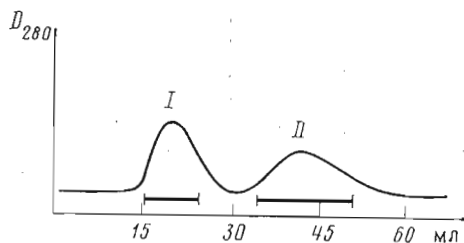


Рис. 10

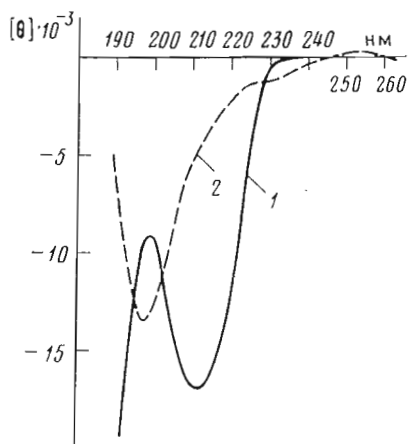


Рис. 9

Рис. 8. Гель-хроматография на колонке (1×39 см) с сефадексом G-50 в 0,1 н. АсОН синтетического образца, выделенного ионообменной хроматографией на СМ-целлюлозе (рис. 7)

Рис. 9. Спектры КД конечного синтетического полипептида с последовательностью α-бунгаротоксина, 0,15 мг в 0,5 мл Н₂О, рН 2,34 (АсОН) (1); природного α-бунгаротоксина, 0,15 мг в 0,5 мл Н₂О, рН 2,40 (АсОН) (2)

Рис. 10. Хроматография на колонке (1×13 см) с DEAE-сефадексом (А-25) в изократическом режиме (0,05 н. NH₄ОAc, рН 7,85) декапептида, обработанного HF+HgF₂

занные с удалением защитных групп. Уникальные свойства жидкого HF сделали его одним из самых популярных реагентов для конечного деблокирования синтетических пептидов, и подавляющее большинство синтезов крупных пептидов осуществлено с его помощью. Однако по мере увеличения числа таких работ стало выявляться все больше побочных реакций, протекающих при обработке защищенных пептидов этим реагентом. Сюда относятся N→O-ацильная миграция [9], расщепление связи Met—X [9, 10], деструкция остатка триптофана [11, 12], внутримолекулярное алкилирование остатка тирозина [13], анизилирование остатка глутаминовой кислоты или образование пирролидона [14, 15], реакции образования сукцинимидного производного из остатка бензильного эфира аспарагиновой кислоты [16] и т. д.

Надо отметить большую зависимость степени протекания этих реакций от природы пептида; по-видимому, этим можно объяснить указания на отсутствие такого рода побочных реакций в ряде работ [17—19]. Основную опасность эти реакции представляют при синтезе крупных пептидов не только из-за резкого понижения выхода продукта, но и из-за сложности конечного выделения нужного пептида из смеси побочных продуктов.

Принципиальной проблемой, ограничивающей использование фтористого водорода в пептидном синтезе, является недостаточная устойчивость природных белков к его действию. Такие белки, как кобротоксин [20] и ингибитор трипсина [21], устойчивы в стандартных условиях обработки HF, рибонуклеаза А проявляет пониженную активность после обработки HF при 0°С [22]. Урогастрон после обработки HF хотя и сохраняет 100% активность, но отличается от нативного белка по электрофоретической

Данные аминокислотного анализа после ферментативного гидролиза декапептида I-10, обработанного $\text{Hg}+\text{HgF}_2$

Аминокислота	Теория	I пик	II пик	Аминокислота	Теория	I пик	II пик
Cys(Cm)	1	0	0,92	Val	1	0,93	1,09
Ala	1	1,00	1,00	Phe	1	1,06	1,20
Thr	3	2,96	2,68	His	1	0,68	0,90

подвижности [23]. Некоторые белки, например ацилпереносящий белок [24], претерпевают полную дезактивацию в жидком HF. Интересные результаты получены при изучении поведения лизоцима в жидком HF. После обработки HF нативный лизоцим сохраняет 70% активности [25]. Аналогичная обработка восстановленного лизоцима и последующее реокисление приводят к падению активности до 5—10% от исходной [25, 26]. При обработке HF восстановленного лизоцима в условиях, моделирующих стадию деблокирования синтетического лизоцима, т. е. в присутствии смеси аминокислот, блокированных группами бензильного типа, по одним данным получен белок с активностью 2—3% [25], а по другим — полностью активный белок с выходом 25% [26], причем выходы после обработки в присутствии взятых по отдельности защищенных аминокислот варьируют от 3 до 10%.

К сожалению, возможности экстраполяции данных об устойчивости в жидком фтористом водороде одних белков на другие крайне ограничены из-за отсутствия каких-либо исследовавшихся химических механизмов де-струкции белков в жидком HF.

Количественная оценка степени протекания побочных реакций в HF проведена в нашей лаборатории в ходе синтеза апамина [27, 28] (18 аминокислотных остатков и 2 дисульфидных мостика). Обработка восстановленного апамина HF приводит после реокисления к неактивному продукту, и только в присутствии 200 экв. цистеина или 1,5 экв. HgF_2 удается выделить полностью активный апамин с выходом 6%. Из защищенного апамина обработкой HF в присутствии вышеуказанных защитных реагентов и последующего реокисления получен с выходом 1% синтетический пептид, не отличающийся от природного образца. Мы полагаем, что последовательное накопление побочных продуктов в ходе обработки HF при увеличении полипептидной цепи от 18 остатков в апаmine до 74 в α -бунгаротоксине при увеличении числа остатков цистеина от 4 до 10 является одной из основных причин исключительно низкого выхода при синтезе α -бунгаротоксина.

В этой связи следует подчеркнуть, что синтез цистеинсодержащих пептидов сопряжен с необходимостью решения ряда проблем, причем сложность предпринятого синтеза возрастает пропорционально числу остатков цистеина в синтезируемом пептиде. Во-первых, цистеинсодержащие пептиды нельзя подвергать гидрированию, что создает дополнительные ограничения при выборе тактики синтеза; во-вторых, синтез осложняется отсутствием подходящих защитных групп для меркаптофункции. Подавляющее большинство крупных пептидов синтезировано с использованием S-бензильной и S-метоксибензильной групп. S-Бензильная группа стабильна в условиях синтеза, однако ее отщепление протекает в очень жестких условиях — 0,5 ч в жидком NH_3 либо HF при 20°C, причем в обоих случаях имеют место многочисленные побочные реакции.

S-Метоксибензильная группа, использованная в синтезах таких белков, как рибонуклеаза А [29, 30], ингибитор трипсина (Kunitz) [31—33], кобротоксин [20], рибонуклеаза T₁ [34], лизоцим [25], также является

источником протекания ряда побочных реакций. По данным Сакакибары, MBzl-группа удаляется в HF за 0,5 ч [35], но не гладко, так как на примере Z-Gly-Cys(MBzl)-OH автором обнаружено протекание N→S-миграции и удаление S—MBzl-группы на 80%. Обратное проведение миграции протекает с образованием тиазолина, что влечет за собой рацемизацию как цистеина, так и соседней аминокислоты [36]. По-видимому, обращение N→S-миграции не протекает на 100% [36] и остающийся S-пептид характеризуется высокой экстинкцией в области 240—270 нм ($E \approx 8000$ — $10\,000$) [37]. Не исключено, что именно соединениями такого типа и обусловлена завышенная экстинкция в области 250—280 нм как синтетического, так и природного токсинов после обработки жидким HF. Еще одной побочной реакцией остатка Cys(MBzl) является возможное образование в ходе синтеза сульфоксида, который в жидком HF в присутствии анизолла превращается в остаток S-метоксифенилцистеина — производное, уже устойчивое к действию фтористого водорода [38]. Кроме того, S-метоксибензильная группировка недостаточно стабильна в условиях удаления N^α-Вос-группы при синтезе крупных пептидов [39].

В последние годы особые надежды возлагались на S-ацетамидометильную группу, устойчивую к действию HF и отщепляемую $Hg(CH_3COO)_2$. Однако два многолетних исследования по синтезу аналога трипсина [40] и аналога лизоцима [41] окончились неудачей именно из-за неполного отщепления Асп-группы на конечной стадии синтеза.

Сложности синтеза цистеинсодержащих пептидов связаны также с проблемой правильного замыкания дисульфидных связей на последней стадии синтеза. Проведение этой сложной реакции в случае пептидов и белков, неспособных к самопроизвольной рекомбинации, может стать одной из критических стадий синтеза, приводящей к низким выходам и требующей тщательной отработки и поиска оптимальных условий ее проведения.

Обсуждая причины неудачных попыток получения синтетического α-бунгаротоксина, необходимо также указать на возможную химическую и оптическую неоднородность защищенного 74-членного полипептида, обусловленную отсутствием удовлетворительных методов выделения и анализа гомогенности крупных защищенных полипептидов. Хотя 74-членный пептид, как и промежуточные фрагменты, был охарактеризован всеми возможными методами синтетической пептидной химии, фактически единственным способом выделения конечных защищенных продуктов оказалась колоночная гель-хроматография на сефадексе LH-20 и смоле Bio-Beads S-XI в ДМФА. Этот метод очистки не обладает ни эффективностью, ни селективностью, достаточными для отделения защищенных пептидов от их близкородственных примесей. Причиной образования близкородственных примесей в ходе синтеза могут служить такие побочные реакции, как транспептидация [39, 42], частичное отщепление защитных групп с боковых функций аминокислот в ходе удаления N^α-Вос-группы [13], трет-бутилирование и окислительная деструкция остатка триптофана [11, 43] и т. д. Для большинства побочных реакций описаны и по возможности использованы в ходе синтеза α-бунгаротоксина условия их минимизации. Вместе с тем пока еще нет способа гарантировать полное подавление протекания нежелательных процессов, поэтому на первый план выступают проблемы очистки и анализа защищенных пептидов. Контроль гомогенности полностью защищенных пептидов, содержащих до 8—10 аминокислотных остатков, эффективно обеспечивается такими высокочувствительными методами разделения и анализа, как адсорбционная колоночная хроматография и тонкослойная хроматография, однако в случае более крупных пептидов эти методы уже не дают желаемых результатов или вовсе неприменимы.

Ряд проблем связан также с необходимостью сохранения оптической чистоты в ходе синтеза. Хотя конденсации всех крупных фрагментов

были проведены по С-концевому оптически неактивному остатку глицина или практически не подвергаемому рацемизации остатку пролина, в ряде более мелких фрагментов мы были вынуждены проводить активацию пептидов по С-концевым остаткам оптически активных, подверженных рацемизации аминокислот. В этом случае контроль за рацемизацией обычно осуществляли методом ГЖХ, а также с помощью ^{13}C -ЯМР-спектроскопии (степень рацемизации не превышала 2%) [1, 2], однако такой контроль был возможен не во всех случаях фрагментных конденсаций, сопровождающихся рацемизацией. Кроме того, хотя для последовательного наращивания пептидной цепи нами были использованы методы, обеспечивающие минимальный риск рацемизации, полной гарантии отсутствия эпимерных продуктов не дает ни один метод образования пептидных связей [44]. Таким образом, указанные причины в сочетании с отсутствием методов разделения смесей диастереомерных крупных защищенных полипептидов не позволяют исключить наличия в конечном защищенном 74-членном полипептиде некоторых количеств диастереомерных примесей.

В ходе синтеза α -бунгаротоксина, являющегося уникальным по высокому содержанию остатков цистеина объектом синтеза, нам пришлось решать все перечисленные проблемы получения цистеинсодержащих пептидов, и если задача правильного замыкания дисульфидных мостиков на примере природного токсина была успешно решена, то перечисленные побочные реакции, протекающие по 10 присутствующим в последовательности α -бунгаротоксина остаткам S-метоксибензилцистеина, стали одной из причин различия синтетического и природного α -бунгаротоксина.

Подводя итоги проведенного исследования, следует отметить, что примененный нами принцип максимума группировок бензильного типа обладает рядом преимуществ по сравнению с другими подходами к получению защищенных полипептидов, поскольку при этом решаются такие проблемы синтеза крупных пептидов, как повышение растворимости защищенных фрагментов, увеличение выходов конденсаций, ограничение протекания побочных реакций. Однако необходимость использования на заключительной стадии синтеза жидкого HF влечет за собой множество нежелательных процессов, могущих свести к нулю предыдущие усилия. Таким образом, этот подход можно рекомендовать лишь для получения относительно небольших пептидов или для более крупных пептидов, не содержащих большого числа таких осложняющих синтез аминокислотных остатков, как остатки цистеина, гистидина, метионина, триптофана. Из итогов работ по синтезу α -бунгаротоксина следует вывод о непригодности метоксибензильной S-защитной группы в синтезе пептидов с высоким содержанием цистеина. Таким образом, перспективы развития пептидного синтеза неразрывно связаны с поисками и апробацией новых защитных групп для меркаптофункции цистеина.

Экспериментальная часть

В работе был использован α -бунгаротоксин (Boehringer Mannheim GmbH); нейротоксин I выделяли по методике [45] с дополнительной очисткой на сефадексе G-50. УФ-спектры были сняты на приборе «Specord UV VIS», и их расчет был осуществлен на основе значений концентраций, полученных по данным аминокислотного анализа; аналогичным образом был осуществлен расчет выходов продуктов. Спектры кругового дихроизма сняты на дихрографе III фирмы «Jobin Yvon».

Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе «Durrum-500» (США); кислотный гидролиз проводили 6 н. HCl в течение 24 ч; окисление надмуравьиной кислотой проводили по методике [46]; карбоксиметилирование SH-групп осуществляли как описано в работе [47]; ферментативный гидролиз декапептида проводили папаином и аминопептидазой M по методике [48]. Токсины восстанавливали дитиотреитом

(10 моль/SН-группа) в течение 4 ч (8 М мочеви́на, 0,1 М EDTA, 0,2 М трис-НСI-буфер, рН 8,2, под аргоном), а затем образец обессоливали на колонке с биогелем Р-2 в 0,1 н. АсОН и лиофилизовали. Контроль за содержанием SН-групп осуществляли по методу Элмана [49]. Токсичность препаратов определяли на мышах при внутрибрюшинном введении.

Авторы выражают благодарность В. И. Цетлину за консультации по вопросам методов белковой химии, Т. Н. Дешко за снятие КД-спектров, И. Н. Половниковой за определение аминокислотной последовательности и В. П. Мальковой за определение токсичности.

Реокисление α -бунгаротоксина. Восстановленный токсин обессоливали на колонке с биогелем Р-2 в 0,1 н. АсОН, затем раствор разбавляли до концентрации белка 0,02 мг/мл и добавляли Na_2HPO_4 до рН 7,5 и NaCl до 0,1 М концентрации. Раствор оставляли при 5° С на 20 сут, затем проводили обессоливание на «Bio-Fiber 50 Beaker» (Bio-Rad, США) и на колонке с биогелем Р-2 в 0,1 н. АсОН; реокисленный α -бунгаротоксин выделяли на колонке с СМ-целлюлозой (рис. 2). Выход фракции с полной биологической активностью составлял 19%.

Обработку жидким HF проводили в приборе фирмы «Protein Research Foundation» (Япония). К 10 мг образца добавляли 5 мл жидкого HF и 0,5 мл анизона. Реакцию проводили 1 ч при 0° С, затем HF удаляли в вакууме (3 ч), образец растворяли в 0,1 н. АсОН, промывали эфиром и обессоливали на колонке с биогелем Р-2 в 0,1 н. АсОН.

Природный НТ-I обрабатывали в приведенных выше условиях, затем образец выдерживали 12 ч в 0,05 М NaHCO_3 ; белок обессоливали на колонке с биогелем Р-2 в 0,1 н. АсОН и на СМ-целлюлозе выделяли полностью активный НТ-I с выходом 50%.

Синтетический защищенный полипептид (40 мг) высушивали в вакууме и обрабатывали HF, затем образец восстанавливали и обессоливали на колонке с биогелем Р-2 в 0,1 н. АсОН. Продукт окисляли в условиях, описанных для природного токсина (см. выше), и при хроматографии на колонке с СМ-целлюлозой при значениях рН и ионной силы, соответствующих выходу природного токсина, не было обнаружено белкового материала.

Восстановленный НТ-I обрабатывали HF, повторно восстанавливали и после обессоливания на колонке с биогелем Р-2 в АсОН реокисляли в условиях, описанных в работе [5]. Хроматографией на колонке с СМ-целлюлозой при значениях рН и ионной силы, соответствующих выходу НТ-I, выделен продукт, не проявляющий активности при дозе 5000 мкг/кг.

Обработка восстановленного НТ-I жидким HF в присутствии различных добавок. а) *Серосодержащие добавки.* Обработку проводили по вышеописанной методике, добавляя защитный реагент в реакционный сосуд, затем образец восстанавливали, обессоливали, определяли количество SН-групп и снимали УФ-спектр (табл. 1, рис. 5). В опыте с меркаптоэтанолом после окисления выделяли на колонке с СМ-целлюлозой 6% НТ-I, LD_{50} 1000 мкг/кг.

б) *добавка HgF_2 .* К 10 мг восстановленного НТ-I в реакционный сосуд добавили 15 экв. (1,5 экв./SН) HgO и обработку проводили как описано выше. Образовавшееся ртутное производное белка разрушали 500 экв. меркаптоэтанолом в 30% АсОН (12 ч, 5° С), а затем обессоливали на биогеле Р-2 в 0,1 н. АсОН и восстанавливали. После окисления выделяли на колонке с СМ-целлюлозой (СМ-32) 6% НТ-I с полной биологической активностью (рис. 6).

Восстановленный α -бунгаротоксин (10 мг) обрабатывали HF в присутствии HgF_2 аналогично НТ-I; после реокисления на колонке с СМ-целлюлозой (рис. 6) выделяли продукт с полной биологической активностью (выход 4%).

Синтетический защищенный 74-членный полипептид (80 мг) высушивали и затем обрабатывали и окисляли аналогично природному α -бунгаро-

тонзину. После окисления продукт выделяли на колонках с СМ-целлюлозой (СМ-32) и сефадексом G-50 (рис. 7, 8). Выделенный препарат не обладал биологической активностью при дозе 1000 мкг/кг.

Обработка синтетического декапептида с последовательностью 1–10 α -бунгаротоксина жидким HF в присутствии HgF₂. Декапептид высушивали и обрабатывали HF аналогично НТ-I, затем декапептид карбоксиметилировали и хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом (А-25) (рис. 10).

Обработка синтетического 74-членного полипептида пиридином в жидком HF. Высушенный образец растворяли в 10% пиридине в жидком HF и обрабатывали по вышеописанной методике.

Обработка В(CF₃COO)₃ синтетического 74-членного полипептида. Образец (3 мг) высушивали, растворяли в 10 мл трифторуксусной кислоты, добавляли 1 мл тиоанизола и 5 мл В(CF₃COO)₃, через 3 ч смесь упаривали и обессоливали на биогеле Р-2 в 0,1 н. АсОН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Михалева И. И., Мягкова М. А., Жукова Г. Ф., Иванов В. Т. Исследование по синтезу α -бунгаротоксина. I. Синтез защищенного гептатриаконтанептида с последовательностью (37–74) α -бунгаротоксина.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 982–1007.
2. Вольпина О. М., Дейгин В. И., Михалева И. И., Иванов В. Т. Исследование по синтезу α -бунгаротоксина. II. Синтез защищенных пептидов последовательности 1–43 α -бунгаротоксина.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1133–1154.
3. Вольпина О. М., Дешко Т. Н., Михалева И. И., Иванов В. Т. Исследование по синтезу α -бунгаротоксина. III. Синтез защищенного 74-членного пептида с полной аминокислотной последовательностью α -бунгаротоксина.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1155–1162.
4. Yang C. C. The disulfide bonds of cobrotoxin and their relationship to lethality.— Biochim. et biophys. acta, 1967, v. 133, № 2, p. 346–355.
5. Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Иванов В. Т. Реокисление восстановленных токсинов яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*.— Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 7, с. 1033–1043.
6. Li C. H., Yamashiro D. The synthesis of a protein possessing with a growth-promoting and lactogenic activities.— J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 26, p. 7608–7609.
7. Sugano H., Taguchi Y., Kanai H., Miyoshi M. Suppression of side reaction on glutamyl peptides during the treatment with hydrogen fluoride.— In: Peptide Chemistry 1977 (Shiba T., ed.), Protein Research Foundation, 1977, p. 23–26.
8. Pless J., Bauer W. Boron tris (trifluoroacetate) for cleaving protective groups in peptide chemistry.— Angew. Chem., 1973, v. 85, № 4, p. 142.
9. Lenard J. Reaction of proteins, carbohydrates, and related substances in liquid hydrogen fluoride.— Chem. Rev., 1969, v. 69, № 5, p. 625–638.
10. Lenard J., Shally A. V., Hess G. P. Specific cleavage of C-methionyl peptide bonds in HF.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, v. 14, № 5, p. 498–502.
11. Löw M., Kisfaludy L., Sohar P. *tert*-Butylierung des Tryptophan indolringes während der Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe bei Peptidsynthesen.— Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1978, v. 359, № 12, p. 1642–1651.
12. Lenard J., Hess G. P. Specific cleavage of peptide bonds (II). Specific cleavage of peptide chains based on the HF induced N to O acyl shift.— J. Biol. Chem., 1964, v. 239, № 10, p. 3275–3281.
13. Erickson B. W., Merrifield R. B. Acid stability of several benzylic protecting groups used in solid-phase peptide synthesis. Rearrangement of O-benzyltyrosine to 3-benzyltyrosine.— J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, № 11, p. 3750–3756.
14. Sano S., Kowanishi S. Hydrogen fluoride-anisol catalyzed reaction with glutamic acid containing peptides.— J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 12, p. 3480–3484.
15. Feinberg R. S., Merrifield R. B. Modification of peptides containing glutamic acid by hydrogen fluoride-anisol mixtures. γ -Acylation of anisole or the glutamyl nitrogen.— J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 12, p. 3485–3496.
16. Yang C. C., Merrifield R. B. The β -phenacyl ester as a temporary protecting group to minimize cyclic imide formation during subsequent treatment of aspartyl peptides with HF.— J. Org. Chem., 1976, v. 41, № 6, p. 1032–1041.
17. Lenard J., Robinson A. B. Use of hydrogen fluoride in Merrifield solid-phase peptide synthesis.— J. Amer. Chem. Soc., 1967, v. 89, № 1, p. 181–182.
18. Sakakibara S., Nakamizo N., Kishida Y., Yoshimura S. Use of anhydrous hydrogen fluoride in peptide synthesis. III. Synthesis of bradykinin.— Bull. Chem. Soc. Jap., 1968, v. 41, № 6, p. 1477–1479.

19. *Baba T., Sugiyama H., Seto S.* Rearrangement of α - to β -aspartyl peptide with anhydrous hydrogen fluoride.—*Chem. Pharm. Bull.*, 1973, v. 21, № 1, p. 207–209.
20. *Izumiya N., Aoyagi H., Noda K., Yonezawa H., Takahashi N., Waki M., Kato T., Yang C. C.* Synthesis of cobrotoxin.—*Jap. J. Med. Sci. and Biol.*, 1972, v. 25, № 3, p. 215–225.
21. *Rocchi R., Benassi C. A., Tomatis R., Ferroni R., Menegatti E.* On the reaction of acetamido-methanol with native and reduced bovine pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor).—*Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1976, v. 8, № 1, p. 167–175.
22. *Koch A. L., Lamout W. A., Katz J.* Effect of anhydrous strong acids on ribonuclease and lysozyme.—*J. Arch. Biochem. and Biophys.*, 1956, v. 63, № 1, p. 106–116.
23. *Camble R., Petter N. N.* Fragment condensation and protonated arginine in solid phase synthetic studies on sequence 1–47 of urogastron.—In: *Peptides 1976* (Loflet A., ed.), Editions de l'Universite de Bruxelles, Belgium, 1976, p. 299–307.
24. *Hancock W. S., Prescott D. J., Nutty W. L., Weintraub J., Vagelos P. R., Marshall G. R.* The synthesis of a protein with acyl carrier protein activity.—*J. Amer. Chem. Soc.*, 1971, v. 93, № 7, p. 1799–1800.
25. *Sharp J. J., Robinson A. B., Kamen M. P.* Synthesis of a polypeptide with lysozyme activity.—*J. Amer. Chem. Soc.*, 1973, v. 95, № 18, p. 6097–6108.
26. *Aimoto S., Shimonishi Y.* Influence of anhydrous hydrogen fluoride on hen egg-white lysozyme. II. Effects on reduced hen egg-white lysozyme.—*Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1976, v. 49, № 1, p. 317–320.
27. *Нуриддинов А. Р., Елякова Е. Г., Малькова В. П., Цетлин В. И., Иванов В. Т.* Восстановление-реокисление апамина и его взаимодействие с жидким фтористым водородом.—*Биоорганич. химия*, 1978, т. 4, № 10, с. 1314–1321.
28. *Нуриддинов А. Р., Жукова Г. Ф., Цетлин В. И., Иванов В. Т.* Синтез апамина — нейротоксина яда пчелы.—*Биоорганич. химия*, 1978, т. 4, № 10, с. 1322–1331.
29. *Fujii N., Koyama K., Yajima H.* Synthesis of the protected pentanonacontapeptide, bovine pancreatic ribonuclease A (30–124).—In: *Peptide Chemistry 1977* (Shibo T., ed.), Protein Research Foundation, 1977, p. 201–204.
30. *Yajima H., Fujii N.* Chemical synthesis of bovine pancreatic ribonuclease A.—*J. Chem. Soc. (Chem. Commun.)*, 1980, № 3, p. 115–116.
31. *Noda K., Terada S., Mitsuyasu N., Waki M., Kato T., Izumiya N.* Synthesis of a peptide with basic pancreatic trypsin inhibitor activity.—*Naturwiss.*, 1971, v. 58, № 3, p. 147–148.
32. *Tan N. H., Kaiser E. T.* Studies on solid-phase synthesis of bovine pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) and the characterization of the synthetic material.—*J. Org. Chem.*, 1976, v. 41, № 17, p. 2787–2793.
33. *Tan N. H., Kaiser E. T.* Synthesis and characterization of a pancreatic trypsin inhibitor homologue and a model inhibitor.—*Biochemistry*, 1977, v. 16, № 8, p. 1531–1541.
34. *Waki M., Mitsuyasu N., Terada S., Matsuuro S., Kato T., Izumiya N.* Synthesis of polypeptides corresponding to ribonuclease T₁ and its analog, [59-tyrosine]ribonuclease T₁.—*Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 61, № 2, p. 576–582.
35. *Sakakibara S.* The use of hydrogen fluoride in peptide chemistry.—In: *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins* (Weinsten B., ed.), v. 1. N. Y.: 1974, p. 51–85.
36. *Hirotsu Y., Shibo T., Kaneko T.* Synthetic studies of bacitracin. IV. Synthesis of triazoline peptides by iminoether coupling method.—*Bull. Chem. Soc. Japan*, 1967, v. 40, № 12, p. 2945–2949.
37. *Shimizu M., Ohta C., Nagase O., Okada S., Hosokawa Y.* Pantothenic acid and its related compounds (I). Synthesis of pantethine.—*Chem. Pharm. Bull.*, 1965, v. 13, № 2, p. 180–188.
38. *Yajima H., Funavoshi S., Fujii N., Akaji K., Irie H.* Behaviour of S-substituted cysteine sulfoxide under acidolytical deprotecting conditions.—*Chem. Pharm. Bull.*, 1979, v. 27, № 5, p. 1060–1061.
39. *Martinez J., Bodanszky M.* Side reactions in peptide synthesis. IX. Suppression of the formation of aminosuccinyl peptides with additives.—*Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1978, v. 12, № 5, p. 277–283.
40. *Tomatis R., Guarneri M., Guggi A., Salvadori S., Rocchi R.* Studies on trypsin inhibitors. Part IX. Synthesis and trypsin inhibitory activity of the duopentacontapeptide corresponding to the amino acid sequence of porcine pancreatic secretory trypsin inhibitor II (Kazal).—*Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1979, v. 14, № 4, p. 347–355.
41. *Kenner G. W., Galpin I. J., Ramage R.* Synthetic studies directed towards the synthesis of a lysozyme analogue.—In: *Peptides, structure and biological function* (Gross E., Meienhofer J., eds). Pierce Chemical Company, 1979, p. 431–438.
42. *Bodanszky M., Kwei J. Z.* Side reactions in peptide chemistry. VII. Sequence dependence in formation of aminosuccinyl derivatives from β -benzyl-aspartyl peptides.—*Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1978, v. 12, № 1, p. 69–74.
43. *Jaeger E., Thamm P., Knof S., Wunsch E.* Nebenreaktionen bei Peptidsynthesen. IV. Charakterisierung von C- und C.N-*tert*-butylierten tryptophan-derivaten.—*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1978, B. 359, № 12, S. 1629–1651.

44. Finn F. M., Hofmann K. The synthesis of peptides by solution methods with emphasis on peptide hormone. Chapter 6. Racemization.— In: The Proteins, v. III (Neurath H., Hill R. L. eds). N. Y.: Acad. Press, 1976, p. 179.
45. Таракулов Я. X., Сажибов Д. H., Сорокин В. M., Юкельсон Л. Я. Разделение яда среднеазиатской кобры фильтрацией в геле сефадекса и определение биологической активности полученных фракций.— Биохимия, 1969, т. 34, № 6, с. 1119—1122.
46. Schrom E., Moore S., Bigwood E. J. Determination of cysteine as cysteic acid.— Biochem. J., 1954, v. 57, № 1, p. 33.
47. Бэйли Дж. Методы химии белков. М.: Мир, 1965, с. 105.
48. Gutte B., Merrifield R. B. The synthesis of ribonuclease A.— J. Biol. Chem., 1971, v. 246, № 6, p. 1922—1941.
49. Ellman G. L. Tissue sulphhydryl groups.— Arch. Biochem. and Biophys., 1959, v. 82, № 1, p. 70—77.

Поступила в редакцию
26.XI.1980

SYNTHETIC STUDIES ON α -BUNGAROTOXIN. IV. INVESTIGATION OF NEUROTOXIN I (*NAJA NAJA OXIANA*) AND α -BUNGAROTOXIN STABILITY AGAINST LIQUID HYDROGEN FLUORIDE. DEBLOCKING OF FULLY PROTECTED 4-MEMBERED PEPTIDE WITH THE α -BUNGAROTOXIN AMINO ACID SEQUENCE

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

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

Reduced α -bungarotoxin was reoxidized to the active product in a 19% yield. Native neurotoxin I from the venom of Middle Asian cobra *Naja naja oxiana* was shown to be quite stable to the action of liquid HF. This neurotoxin after reduction of disulfide bonds became very unstable under such a treatment as evidenced by the irreversible drop in the number of SH-groups, formation of polymers and by the lack of the activity for the reoxidized product. As a result of searching for scavenger to minimize the HF-induced destruction, the conditions were found which allowed to regenerate the fully active neurotoxin I and α -bungarotoxin in 4–6% yield after the reduction, HF treatment and oxidation. From fully protected 74-membered peptide corresponding to the α -bungarotoxin amino acid sequence, after deblocking with HF in the presence of HgF₂ and subsequent oxidation, a product was isolated in 0.5 yield which had the same N-terminal amino acid as native α -bungarotoxin and similar amino acid analysis, as well as chromatographic patterns on Sephadex G-50 or CM-cellulose columns. However, the synthetic product differed markedly from the native toxin in UV and CD spectra and was biologically inactive. Main results of the synthetic studies on α -bungarotoxin are discussed.