



УДК 577.112.6

СИНТЕЗ ОКТАПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФРАГМЕНТЫ
ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ *lac*-РЕПРЕССОРА

Шибнев В. А., Газулян А. Е., Финогорова М. П.

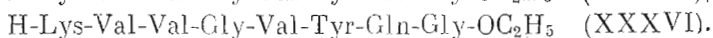
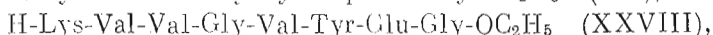
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Синтезированы четыре октапептида, включающие в себя дипептидные фрагменты первичной структуры *lac*-репрессора. Общая схема синтеза заключалась в получении тетрапептидов последовательным наращиванием с С-конца методом смешанных ангидридов и их конденсации в октапептиды.

В настоящее время довольно подробно исследован ряд белок-нуклеиновых комплексов. Однако до сих пор еще неясны те закономерности, которые определяют специфическое взаимодействие участков полипептидной цепи белка с основаниями нуклеиновых кислот. Вероятно, в основе белок-нуклеинового узнавания лежат некие общие принципы, поиски которых периодически приводят к созданию концепций, касающихся природы групп, обеспечивающих такое взаимодействие белка с нуклеиновой кислотой. Так, одна из этих концепций предусматривает, что амидные группы полипептидного остова белковой молекулы «подстраиваются» к соответствующим основаниям нуклеиновой кислоты с помощью боковых групп аминокислотных остатков. Конформационные расчеты, проведенные для этого случая, показали, что подобная организация возможна, если полипептидная цепь в зоне взаимодействия с основаниями нуклеиновой кислоты имеет деформированную антипараллельную β -структуру [1].

Наша работа посвящена синтезу модельных олигопептидов, которые можно использовать для проверки некоторых положений такой концепции. В данном случае применение олигопептидов позволяет выявить как роль отдельных аминокислотных остатков в процессе белок-нуклеинового взаимодействия, так и влияние элементов вторичной структуры полипептидной цепи, заложенных в используемых пептидах.

Что касается конкретного выбора аминокислотной последовательности в синтезированных октапептидах, которые в дальнейшем будут превращены в 16-членные полипептиды, то мы исходили из следующих посылок. Известно, что β -структура в олиго- и полипептидах может «наводиться» при определенном сочетании соответствующих аминокислотных остатков, например -Val-Val-, -Lys-Val-, -Asp-Val-, -Tyr-Gln- и др. Интересно, что подобный тип дипептидных фрагментов встречается в «узнающей» части полипептидной цепи наиболее изученного регуляторного белка — *lac*-репрессора [2], специфически взаимодействующего с *lac*-оператором [3]. Именно эти дипептидные фрагменты и вошли в пептидную цепь следующих синтезированных октапептидов:



Теоретический конформационный анализ в попарно-аддитивном приближении [4], проведенный для первого октапептида А. А. Аджубеем (ИМБ АН СССР) и В. В. Поройковым (ИИИ по БИХС), указывает на высокую вероятность образования в нем β -структуры. Остальные три

Схема 1

	Lys	Val	Val	Val	Gly	Tyr	Asp	Val	Leu (дан ряда (XIII) → (XX))
		Z-OH HCl·H	Z-OH HCl·H	Z-OH HCl·H	Z-OH HCl·H-OCH ₃			Z-OH HCl·H	Z-OH HCl·H-OCH ₃ *
				(I)	(I)				(I) (XIII)
		Z-OH HCl·H	Z-OH HCl·H	(II)	(II)		OBzl		(II) (XIV)
				(III)	(III)		OBzl		(VII) (XV)
	Boc	Z-OH HCl·H		(IV)	(IV)	Boc	OBzl		(VIII) (XVI)
				(V)	(V)	Boc	OBzl		(IX) (XVII)
	Boc	Z		(VI)	(VI)	Boc	OBzl		(X) (XVIII)
	Boc	Z		(XIX)	(XIX)	Bzl	OBzl		
	Boc	Z		(XX)	(XX)	Bzl	OBzl		
	CF ₃ COOH·H								
	CF ₃ COOH·H								
	H-								

* -OC₂H₅ для пептидов (XIII) - (XX)

Схема 2

Glu* (для ряда (XXI) → (XXVIII))

	Lys	Val	Val	Gly	Val	Tyr	Gln	Gly
		Z-OH HCl·H	Z-OH HCl·H	Z-OH HCl·H-OCH ₃	Z-OH HCl·H		Z-OH HCl·H	OC ₂ H ₅
			(I)	OCН ₃			(XXIX) (XXI)	OC ₂ H ₅
		Z-OH HCl·H	(II)	OCН ₃		Bzl-OH	(XXX) (XXII)	OC ₂ H ₅
		Z	(III)	OCН ₃	Boc	Bzl	(XXXI) (XXXIII)	OC ₂ H ₅
	Z-OH HCl·H	(IV)	OCН ₃	OCН ₃	Boc	Bzl	(XXXII) (XXIV)	OC ₂ H ₅
	Z	(V)	OCН ₃	OCН ₃	Boc	Bzl	(XXXIII) (XXXV)	OC ₂ H ₅
	Z	(VI)	OH CF ₃ COOH·H	OH CF ₃ COOH·H	Boc	Bzl	(XXXIV) (XXXVI)	OC ₂ H ₅
	Z	(XXXV) (XXVII)				Bzl		OC ₂ H ₅
CF ₃ COOH·H						Bzl		OC ₂ H ₅
CF ₃ COOH·H						Bzl		OC ₂ H ₅
II			(XXXVI) (XXVIII)					OC ₂ H ₅

* В нумерации (XXI) - (XXVII) Glu(OBzl)

последовательности получили путем замены одной из аминокислот на гомологичную и перестановкой аминокислотных остатков, что, вероятно, не должно было существенно повлиять на конформацию пептида.

Общий план синтеза октапептидов состоял в получении тетрапептидных фрагментов, содержащих на С-конце остаток глицина, и их последующей конденсацией методом смешанных ангидридов. Синтез тетрапептидов (V), (IX), (XV), (XXV) и (XXXIII) осуществлялся последовательным наращиванием с С-конца с максимальной защитой функциональных групп аминокислот (схемы 1, 2).

Синтез пептидов (XIII), (XV), осуществленный как методом смешанных ангидридов (а), так и карбодимидным методом с использованием 1-оксисбензтриазола (б), показал, что при одинаковой степени оптической чистоты идентичных пептидов в первом случае выход продуктов выше, а очистка их легче, чем во втором. Поэтому все остальные пептиды были синтезированы методом смешанных ангидридов при температуре от -15 до -18°C с использованием в качестве основания N-метилморфолина (время активации 10 мин).

Выбор защитных групп определялся условием сведения к минимуму нежелательных побочных реакций при удалении N^α-защитных группировок на промежуточных стадиях синтеза. Для защиты α-аминогрупп лизина, а также валина в соединениях (XXV) и (XXXIII), тирозина, аспарагиновой и глутаминовой кислот применяли *tert*-бутилоксикарбонильную группу, а для валина в соединениях (I) и (III), лейцина и глутамина — бензилоксикарбонильную. Карбоксильную группу С-концевого глицина блокировали этерификацией (метилвый эфир в дипептиде (I) и этиловый — в дипептидах (XIII), (XXI), (XXIX)). Для защиты боковых функциональных групп использовали бензилоксикарбонильную группу в случае лизина и бензильную — для тирозина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Такое сочетание защитных групп позволило избирательно удалять их; способ удаления на промежуточных стадиях зависел от природы пептида и блокирующей группы. В случае соединений (I), (III), (XIII), (XXIX) бензилоксикарбонильную группу удаляли гидрированием над палладиевой чернью. При отщеплении *tert*-бутилоксикарбонильной группы в пептидах (VII), (IX), (XV), (XVII), (XXI), (XXIII), (XXV), (XXXI), (XXXIII) действием раствора хлористого водорода в диоксане или метаноле наблюдали образование небольшого количества побочных соединений, обусловленное лабильностью бензильной группы в данных условиях. Деблокирование действием трифторуксусной кислоты проходило быстро и с лучшими результатами. Попытка удаления бензилоксикарбонильной и бензильной защит с октапептидов с последующим снятием *tert*-бутилоксикарбонильной группы не дала желаемых результатов, так как из-за плохой растворимости защищенных октапептидов гидрирование над палладиевой чернью проводилось в диметилформамиде и бензилоксикарбонильная группа удалялась не полностью. Более удобным оказался иной подход: удаление *tert*-бутилоксикарбонильной защиты действием трифторуксусной кислоты и последующее гидрирование трифторацетатов октапептидов в ледяной уксусной кислоте над палладиевой чернью. Полноту удаления защитных групп контролировали с помощью хроматографии на бумаге и электрофоретически. Пропуская трифторацетаты через колонку с дауэксом AG 2×8 в ацетатной форме, получали ацетаты октапептидов. Эфиры октапептидов (XII), (XX), (XXVIII) и (XXXVI) получали выдерживанием ацетатов в вакуум-эксикаторе над КОН.

Индивидуальность полученных соединений контролировали хроматографией в тонком слое. Вещества характеризовали температурой плавления, удельным оптическим вращением, а октапептиды — и данными аминокислотного анализа. Характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 1–3.

Характеристика синтезированных защищенных пептидов

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С (растворитель)	$[\alpha]_D^{23}$, с 1 (растворитель)	R_f					
				А	Б	В	Г	Д	Е
(I)	95	160-161,5 (CHCl ₃ - гексан)	-32,6 * (ЭА)				0,6		0,8
(III)	84	193-194 (H ₂ O)	-45,5 (MeOH)						0,79
(V)	72	189-193 (MeOH - эфир)	-36 (CHCl ₃)	0,92					0,82
(VI)	97	236-239 (MeOH - эфир)		0,75		0,35			0,7
(VII)	61	129-133 (ЭА - гексан)	-44 (MeOH)				0,56		0,83
(IX)	60	169-171 (EtOH)	-16 (CHCl ₃)				0,56		0,84
(XI)	77	236-239 (MeOH) **						0,74	0,85
(XIIa)	76	99-101 (EtOH)	-16,9 (ЭА)				0,6		0,8
(XIIб)	69	100-101 (EtOH)	-16,5 (ЭА)				0,6		0,8
(XVa)	89	98-100 (EtOH)	-40 (MeOH)		0,82		0,6		0,8
(XVб)	59	98-100 (EtOH)	-40 (MeOH)		0,8		0,6		0,8
(XVII)	55	122,5-125 (EtOH)	-14 (CHCl ₃)				0,6		0,82
(XIX)	84,5	215-218 (MeOH) **						0,7	0,8
(XXI)	66	69-71 (ЭА - гексан)	-10 (MeOH)				0,6		0,85
(XXIII)	92	123-125 (ЭА - петр. эфир)	-8 (MeOH)		0,9		0,6		0,88
(XXV)	84	183-184 (EtOH)	-20 (CHCl ₃)				0,6		0,88
(XXVII)	82	275-278 (MeOH) **						0,76	0,8
(XXIX)	72	168-170 (MeOH)	-14 (MeOH)			0,7	0,7		0,6
(XXXI)	64	190-192,5 (MeOH)	-4 (MeOH)	0,85		0,8			0,75
(XXXIII)	69	217-219 (CHCl ₃ - MeOH)	-15 ***, CHCl ₃ - MeOH (5 : 1)	0,87			0,5		0,8
(XXXV)	33	249-252 (MeOH) **						0,76	0,8

* При 31° С.

** Растирали в горячем метаноле.

*** с 0,4.

Экспериментальная часть

В работе использовались *L*-аминокислоты, выпускаемые фирмами Chemapol (ЧССР), Reanal (ВНР), Sigma (США). Производные аминокислот получали по описанным методикам [5, 6]. Все используемые для конденсации и удаления защитных групп растворители предварительно абсолютировали и перегоняли. ТСХ проводили на пластинках Silufol (ЧССР) в системах: пиридин - уксусная кислота - *n*-бутанол - вода,

Характеристика синтезированных хлоргидратов и трифторацетатов эфиров пептидов

Соединение	Выход, %	Растворители для очистки	R_f				
			А	Б	В	Г	Е
(II)	93	MeOH — эфир		0,48			
(IV)	79	ЭА — эфир — гексан					0,14
(VIII)	97	CHCl ₃ — гексан		0,7		0,2	
(X)	98	Ацетон — гексан, CHCl ₃ — эфир	0,75	0,75 0,48	0,7		0,6
(XIV)	99	MeOH — эфир				0,57	
(XVI)	76	ЭА — гексан				0,49	0,58
(XVIII)	80	Ацетон — гексан					0,6
(XXII)	97	Гексан				0,3	0,5
(XXIV)	81	ЭА — гексан		0,6			
(XXVI)	69	MeOH — эфир		0,8	0,8	0,3	
(XXX)	96	MeOH — эфир	0,6	0,3			
(XXXII)	88	EtOH	0,75	0,65	0,63		0,4
(XXXIV)	98	Гексан		0,6	0,7		0,4

10 : 3 : 15 : 12 (А); *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 1 : 3 : 1 (Б); *втор*-бутанол — 3% аммиак, 100 : 44 (В); толуол — диоксан — циклогексан — уксусная кислота, 10 : 6 : 3 : 1 (Г); хлороформ — метанол, 9 : 1 (Д); хлороформ — метанол, 60 : 13 (Е). Вещества на хроматограммах обнаруживали нингидрином, парами иода или прожиганием над пламенем. Электрофорез на бумаге FN-18 (ГДР) проводили в течение 1,5 ч в 0,2 М водном растворе уксусной кислоты, pH 2,8, при напряжении 1000 В и токе 7 мА. ВХ проводили на бумаге Whatman 4 (Англия) в системе *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 5 : 4 : 1.

Температуру плавления определяли на приборе Voëtius (ГДР) при скорости плавления 4°С/мин. Удельное оптическое вращение измеряли на автоматическом поляриметре А1-ЕПЛ (СССР).

Кислотный гидролиз октапептидов проводили в 6 н. соляной кислоте при 105°С в запаянных ампулах в течение 24 ч. Аминокислотный состав определяли на автоматическом анализаторе Biotronic LC2000.

При упаривании растворителей в вакууме избегали нагревания выше 40°С.

Z-Val-Gly-OCH₃ (I). Раствор 9 г (35,8 ммоль) *N*-бензилоксикарбонил-валина в 45 мл тетрагидрофурана с 3,93 мл (35,8 ммоль) *N*-метилморфолина охлаждали до -15÷-18°С и добавляли 4,68 мл (35,8 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 10 мин добавляли раствор 4,48 г (35,8 ммоль) хлоргидрата метилового эфира глицина в 25 мл тетрагидрофурана с 3,93 мл (35,8 ммоль) *N*-метилморфолина, охлажденный до -15÷-18°С. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при температуре от -15 до -18°С и 1 ч при 20°С, затем тетрагидрофуран упаривали, остаток растворяли в 200 мл хлороформа и промывали 1 н. HCl (3×20 мл), H₂O (4×20 мл), 5% NaHCO₃ (3×20 мл), H₂O (3×20 мл), сушили безводным Na₂SO₄ и упаривали. Остаток растирали с гексаном (2×15 мл), отфильтровывали, переосаждали из хлороформа гексаном.

Аналогично получали соединения (III), (V), (VII), (IX), (XI), (XIIIa), (XVa), (XVII), (XIX), (XXI), (XXIII), (XXV), (XXVII), (XXIX), (XXXI), (XXXIII) и (XXXV) (табл. 1). В случае недостаточной растворимости исходных компонентов в реакционную смесь добавляли диметилформамид. При обработке соединений (V), (VII), (IX), (XVa), (XVII), (XXI), (XXIII), (XXV) вместо 1 н. HCl использовали 10% лимонную кислоту. Обработку производных (XI), (XIX), (XXVII), (XXXV) проводили следующим образом: растворитель упаривали до 1/3 первоначального объема и из полученной массы продукт осаждали 10%

Характеристика синтезированных октапептидов

Соединение	Выход, %	R_f		Аминокислотный анализ						
		A	B	Lys	Val	Gly	Tyr	Asp	Leu	Glu
(XII)	30	0,54	0,6	1,00(1)	3,17(3)	2,06(2)	0,92(1)	1,11(1)		
(XX)	71	0,5	0,6	0,83(1)	2,03(2)	2,00(2)	0,93(1)	1,06(1)	1,00(1)	
(XXVIII)	78	0,53	0,64	1,00(1)	2,93(3)	2,07(2)	0,95(1)			1,12(1)
(XXXVI)	73	0,8	0,58	1,00(1)	3,1(3)	1,87(2)	1,04(1)			0,94(1)

раствором лимонной кислоты, охлажденным в ледяной бане. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали последовательно H_2O , 0,5 н. $NaHCO_3$, H_2O , а затем растирали в горячем метаноле.

$HCl \cdot H-Val-Gly-OCH_3$ (II). 8 г (24,8 ммоль) дипептида (I) растворяли в 80 мл метанола, добавляли 2,8 мл (24,8 ммоль) 38% раствора HCl в метаноле и гидрировали 12 ч в слабом токе водорода над Pd -чернью. Затем катализатор отфильтровывали и фильтрат упаривали в вакууме при 25° С.

Аналогично получали соединения (IV), (XIV), (XXX) (табл. 2).

$Woc-Lys(Z)-Val-Val-Gly-OH$ (VI). 2 г (3,08 ммоль) тетрапептида (V) растворяли в 100 мл метанола, добавляли 34 мл (3,4 ммоль) 0,1 н. $NaOH$ и смесь выдерживали 1,5 ч при 20° С. Затем раствор подкисляли 20% раствором лимонной кислоты до pH 7–6, упаривали до появления осадка и экстрагировали хлороформом (3×25 мл). Экстракт промывали H_2O , сушили безводным Na_2SO_4 , упаривали и остаток пересаждали из метанола эфиром.

$CF_3COOH \cdot H-Asp(OBzl)-Val-Gly-OCH_3$ (VIII). К 7 г (14,18 ммоль) трипептида (VII) добавляли 19 мл CF_3COOH и выдерживали 50 мин при 20° С. Затем в реакционную смесь добавляли 20 мл бензола и упаривали в вакууме при 25° С. Процедуру повторяли трижды. Остаток растирали с гексаном и пересаждали из хлороформа гексаном.

Аналогично получали соединения (X), (XVI), (XVIII), (XXII), (XXIV), (XXVI), (XXXII), (XXXIV) (табл. 2).

$Z-Leu-Gly-OC_2H_5$ (XIIIб). К раствору 2,65 г (10 ммоль) бензиплюксикарбониллейцина и 2,02 г (15 ммоль) 1-оксисбензтриазола в 15 мл тетрагидрофурана при -15° С прибавляли 2,06 г (10 ммоль) N,N' -дициклогексилкарбодимида, перемешивали 2 ч при -5° С и прибавляли 1,54 г (11 ммоль) хлоргидрата этилового эфира глицина в 15 мл тетрагидрофурана с 1,21 мл (11 ммоль) N -метилморфолина. Перемешивали 2 ч при -5° С и 20 ч при 20° С. Растворитель упаривали, прибавляли 30 мл этилацетата, отфильтровывали от нерастворенного осадка и фильтрат обрабатывали как описано в синтезе дипептида (I). Раствор упаривали до объема 10 мл и оставляли на ночь при 4° С. Отфильтровывали выпавшую N,N' -дициклогексилмочевину. Растворитель упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из этанола.

Аналогично получали соединение (XVб) (табл. 1).

$H-Lys-Val-Val-Gly-Tyr-Asp-Val-Gly-OCH_3$ (XII). 1 г (0,79 ммоль) октапептида (XI) выдерживали 1 ч в 2 мл CF_3COOH . Затем к реакционной смеси прибавляли бензол и упаривали. Остаток растирали с эфиром (3×5 мл) и сушили в вакууме. Полученный порошок растворяли в ледяной уксусной кислоте и гидрировали в слабом токе водорода над Pd -чернью в течение 10 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме при 25° С, остаток растворяли в 5 мл системы (A) и 30 мин перемешивали со смолой дауэкс AG 2×8 в ацетатной форме. Раствор отфильтровывали, упаривали в вакууме и остаток выдерживали 12 ч в вакуум-эксикаторе на KOH .

Аналогично получали соединения (XX), (XXVIII), (XXXVI) (табл. 3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гурский Г. В., Туманян В. Г., Заседателев А. С., Жузе А. А., Гроховский С. Л., Готтх Б. П. Молекулярн. биология, 1975, т. 9, вып. 5, с. 635-651.
2. Platt T., Files J. G., Weber K. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 1, p. 110-121.
3. Riggs A. D., Suzuki H., Bourgeois S. J. Mol. Biol., 1970, v. 48, № 1, p. 67-83.
4. Дашевский В. Г. Конформации органических молекул. М.: Химия, 1974, с. 65-145, 359-399.
5. Fletcher G. A., Jones J. H. Int. J. Pept. Prot. Res., 1972, v. 4, № 3, p. 347-371.
6. Fletcher G. A., Jones J. H. Int. J. Pept. Prot. Res., 1975, v. 7, № 2, p. 91-102.

Поступила в редакцию

10.III.1983

После доработки

6.VII.1983

SYNTHESIS OF OCTAPEPTIDES CONTAINING FRAGMENTS OF *lac*-REPRESSOR PRIMARY STRUCTURE

SHIBNEV V. A., GAZUMYAN A. K., FINOGENOVA M. P.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow,

Four octapeptides containing the dipeptide fragments of the *lac*-repressor primary structure have been synthesized. The general scheme of synthesis consisted in the preparation of tetrapeptides using successive elongation from the C-terminus by the mixed anhydride method followed by their condensation into octapeptides.