



УДК 547.964.4'835

ПРИСОЕДИНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ 2-МЕТОКСИ-6-ХЛОРАКРИДИНОВОЙ ГРУППЫ К ПЕПТИДАМ

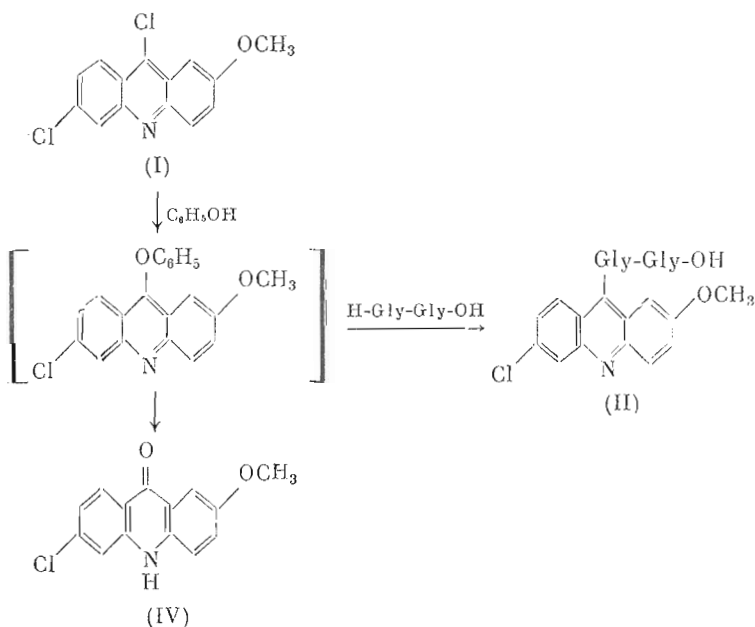
*Шибнев В. А., Финогенова М. П., Полежаев А. И.,
Марьян Л. Н.**

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

** Институт химии им. В. И. Никитина Академии наук ТаджССР, Душанбе*

Осуществлен синтез 2-метокси-6-хлоракридин-9-ил-пептидов (Мса-пептидов) прямым взаимодействием в феноле 2-метокси-6,9-дихлоракридина с ди- и трипептидами, содержащими остатки алифатических аминокислот, иминокислот и лизина. Получены спектры поглощения, возбуждения и испускания флуоресценции и определены величины квантовых выходов синтезированных соединений. Показано, что на эти спектральные характеристики оказывает влияние аминокислотная последовательность пептидов.

Ранее мы сообщали о получении флуоресцентных 2-метокси-6-хлоракридин-9-ил-аминокислот (Мса-аминокислот), которые могут использоваться в пептидном синтезе [1]. Однако в ряде случаев желательнее присоединять Мса-группу непосредственно к пептидам. В настоящей работе мы рассматриваем такую возможность, основанную, как и в работе [1], на взаимодействии 2-метокси-6,9-дихлоракридина (I) с пептидами в при-



сутствии фенола. В качестве примера на схеме приведен синтез Мса-Gly-Gly-OH (II), исходя из диглицина. Однако в случае использования в этой реакции пептидов следовало учитывать, что жесткие условия ее проведения (110–120° С, фенол) могли вызывать как термическую деструкцию пептидов, так и их рацемизацию. Поэтому для исследования применимости такой реакции к пептидам мы провели модельные эксперименты с ди- и трипептидами, содержащими остатки алифатических аминокислот, лизи-

Сокращение: Мса- – 2-метокси-6-хлоракридин-9-ил-

Влияние температуры реакции на удельное вращение аминокислот и пептидов

Соединение	[α] _D ²³ , град			Растворитель	с
	образец	после нагревания в феноле			
		3 ч, 130° С	3 ч, 60° С		
Валин	+26,0	+25,6	—	20% HCl	4
Лейцин	+15,0	+15,0	—	20% HCl	4
H-Gly-Leu-OH	-32,7	-2,9	-32,0	1 н. HCl	1,5
H-Gly-Pro-Ala-OH	-138,7	-35,1	-123,8	H ₂ O	0,85

Таблица 2

Характеристики 2-метокси-6-хлоракридин-9-ил-производных (Mca-X)

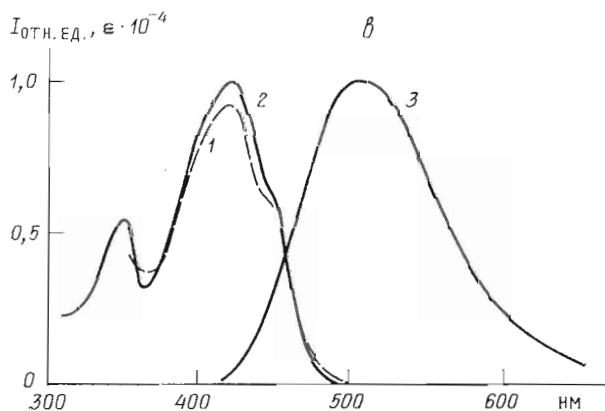
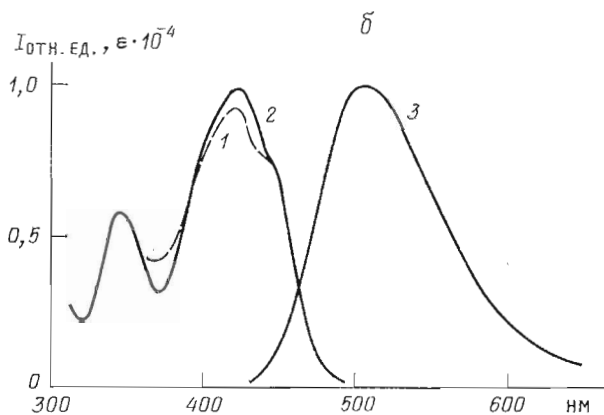
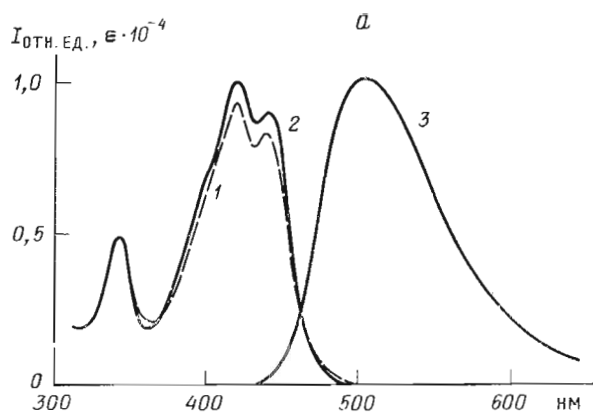
X	Т. пл., °С (с разл.)	R _f в системах *			Выход, %	Квантовый выход	Исходный пептид
		А	Б	В			
-Gly-Gly-OH (II)	158–160	0,06	0,47	0,7	81	0,41	Reanal
-Gly-Pro-Gly-OH (III)	162–165		0,33	0,64	67	0,41	[2] **
-Gly-Gly-OH (V)	216–218		0,37	0,71	42	0,41	Reanal
-Gly-Leu-OH (VI)	205–207	0,1	0,62	0,82	65	0,36	Reanal
-Gly-Pro-OH (VII)	155–157		0,33	0,6	40	0,42	[3]
-Gly-Pro-Pro-OH (VIII)	140–143		0,28	0,6	30	0,38	[4]
-Gly-Pro-Hyp-OH (IX)	176–178		0,3	0,56	80	0,43	[4]
-Gly-Pro-Ala-OH (X)	163–166		0,38	0,63	69	0,41	[5] **
-Gly-Lys-Gly-OH (XI)	203–204	0,2	0,43	49	0,34	(XX)	
-Lys-Ala-Ala-OH (XII)	210–214	0,2	0,41	28	0,18	[6] ***	
-Lys-Lys-Ala-OH (XIII)	230		0,8	17	0,14	[6] ***	
-Lys-Lys-Lys-OH (XIV)	250		0,46	31	0,10	[7] ***	
-Leu-Gly-OH (XV)	285–287	0,61	0,8	30	0,21	[4] **	

* Состав хроматографических систем см. в «Экспериментальной части».

** Описан синтез α -Z-производных, Z-защиту удаляли каталитическим гидрированием над Pd-чернью в метаноле.*** Описан синтез α -Woc-производных, Woc-защиту удаляли аналогично (III).

на и иминокислот. При хроматографическом исследовании продуктов реакции, протекающей в описанных условиях (110–120° С, 3 ч), было обнаружено, что пептиды, включающие в себя алифатические аминокислоты и лизин, вполне устойчивы и образование Mca-производных протекает без значительных побочных процессов. Наоборот, пептиды, содержащие иминокислоты, были недостаточно устойчивы. Так, при получении Mca-Gly-Pro-Gly-OH (III) наряду с основным продуктом реакции в реакционной смеси с помощью ТСХ был обнаружен Mca-Gly-OH. Чтобы избежать расщепления пептидных связей, мы провели эту реакцию в более мягких условиях — при 50–60° С. Действительно, при такой температуре реакция проходит достаточно полно и без каких-либо осложнений, если не считать наличия в реакционной смеси некоторых количеств 2-метокси-6-хлоракридона (схема, соединение (IV)), неизменно образующегося, когда в реакционной смеси присутствуют хотя бы следы воды, и не вступивших в реакцию исходных веществ, которые могут быть легко отделены хроматографически, поскольку в ряде систем имеют величины R_f, сильно отличающиеся от R_f Mca-пептидов.

Для оценки влияния реакционных условий на оптическую чистоту аминокислот и пептидов проведено сравнение величин их удельного оптического вращения до и после нагревания в феноле в течение 3 ч (табл. 1). Оказалось, что алифатические аминокислоты (валин, лейцин) практически не меняют своих оптических свойств при нагревании в феноле даже при 130° С, в то время как пептиды H-Gly-Leu-OH и H-Gly-Pro-Ala-OH почти полностью рацемизируются в этих условиях. Снижение температуры до 60° С уменьшает рацемизацию этих пептидов до 2,1 и 10,7% соответ-



Спектры поглощения (1), возбуждения флуоресценции (2) и испускания флуоресценции (3) Мса-Gly-Pro-Pro-OH (а), Мса-Lys-Ala-Ala-OH (б), Мса-Leu-Gly-OH (в) в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 6,95

ственно. Учитывая эти особенности поведения пептидов, мы проводили реакцию получения Мса-пептидов при 50–60° С.

У полученных Мса-пептидов были изучены спектры поглощения, возбуждения и испускания флуоресценции, а также определены величины квантовых выходов флуоресценции (Φ/Φ_0).

Все синтезированные Мса-пептиды можно разделить на три группы: 1) соединения (II), (III), (V)–(XI) (табл. 2), у которых акридиновый хромофор присоединен через остаток глицина; 2) Мса-пептиды (XII)–(XIV), в которых хромофор присоединен через остаток лизина; 3) соеди-

нение (XV), в котором хромофор присоединен через остаток гидрофобной аминокислоты.

Спектры поглощения соединений всех трех групп в основном сходны (рисунок, кривые 1). Они характеризуются наличием интенсивной полосы с максимумом при 420 нм, имеющей длинноволновое плечо (440—450 нм), и менее интенсивной полосы с максимумом ~395 нм. Вместе с тем в спектрах поглощения соединений этих групп имеются некоторые различия. Если интенсивность полосы при 420 нм для соединений всех трех групп практически одинакова ($\epsilon \sim 9,3 \cdot 10^3$), то интенсивность полосы при 395 нм у соединений первой группы несколько ниже, а интенсивность плеча при 440 нм выше, чем у соединений второй и третьей группы. Кроме того, обращает на себя внимание различие в ширине отдельных полос (395, 420 и 440 нм): у соединений первой группы ширина полос существенно меньше, чем у соединений второй и третьей групп. Эта закономерность особенно хорошо заметна на дополнительной полосе с максимумом при 345 нм. Необходимо отметить также, что интенсивность полосы при 345 нм у соединений второй и третьей групп несколько выше, чем у соединений первой группы.

Спектры возбуждения флуоресценции соединений всех трех групп близки по форме соответствующим спектрам поглощения (см. рисунок). Спектры испускания флуоресценции имеют максимум при 505 нм и подобны по своей форме (рисунок, кривые 3). Наибольшие различия наблюдаются в величине квантового выхода флуоресценции. Все соединения первой группы, не содержащие заряженного лизинового остатка, имеют квантовый выход $0,41 \pm 0,01$, что несколько выше, чем квантовый выход Msa-Gly-OH, — 0,29 [1]. Появление заряженного лизинового остатка во втором положении трипептида приводит к понижению квантового выхода у соединения (XI) до 0,34. Присоединение хромофора к трипептиду непосредственно через остаток лизина вызывает более выраженное уменьшение квантового выхода, который падает пропорционально числу остатков лизина: 0,18, 0,14 и 0,10 для соединений (XII), (XIII) и (XIV) соответственно. Msa-Leu-Gly-OH (XV) имеет квантовый выход 0,21, а Msa-Gly-Leu-OH (VI) — 0,36. Таким образом, из полученных данных можно сделать вывод, что на величину квантового выхода флуоресценции влияет не только ближайший к хромофору остаток, но и более удаленные.

Экспериментальная часть

2-Метокси-6,9-дихлоракридин получен как описано в работе [8]. Фенол предварительно перегоняли. Контроль чистоты и идентификацию полученных соединений осуществляли с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системах: метанол — хлороформ, 13 : 60 (А); *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 10 : 3 : 1 (Б); *n*-бутанол — вода — уксусная кислота — пиридин, 15 : 12 : 3 : 10 (В); фенол — вода, 3 : 1 (Г); *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 3 : 1 : 1 (Д). Детекцию соединений осуществляли в УФ-свете, парами воды и нингидрином. Препаративное деление проводили на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системе А, колоночную хроматографию — на силикагеле Л 40/100 мкм (ЧССР) (колонок 40×2 см, скорость элюции 0,5 мл/ч). Вещество растворяли в системе В и наносили на сухой носитель.

Гидролиз акридилилпептидов осуществляли 6 н. HCl в запаянных ампулах при 105°С в течение 20 ч. При хроматографировании кислотных гидролизатов Msa-пептидов в системе А идентифицировали наличие акридона (IV) с *R_f* 0,76, а в системах Г и Д — соответствующих аминокислот.

Температуру плавления (неисправленная) определяли на приборе Voëtius (ГДР) при скорости нагревания 5°С/мин, удельное оптическое вращение — на автоматическом поляриметре А1-ЕПЛ (СССР).

Спектры поглощения, флуоресценции (возбуждения и испускания) и квантовый выход синтезированных соединений были получены, как описано в работе [1]. За стандартное вещество с квантовым выходом ~1 принимали раствор 9-аминоакридина в этаноле.

Мса-Gly-Gly-OH (II). Смесь 0,2 г (0,72 ммоль) 2-метокси-6,9-дихлоракридина (I) и 1 г фенола перемешивали 40 мин при 100°С. Затем прибавляли 0,095 г (0,72 ммоль) диглицина и перемешивали 3 ч при 60°С. После завершения реакции продукт осаждали эфиром, осадок промывали эфиром (2×30 мл) и тщательно растирали в кипящем ацетоне (2×5 мл) для удаления следов акридона (IV). Получали соединение (II) в виде ярко-желтого кристаллического вещества.

Мса-пептиды (III), (V) — (X) и (XV) получали аналогично (II), исходя из соединения (I) и соответствующих пептидов (см. табл. 2).

Вос-Lys(Z)-Gly-OCH₃ (XVI). К 3,8 г (10 ммоль) Вос-Lys(Z)-OH, растворенного в 20 мл тетрагидрофурана, при перемешивании прибавляли 1,1 мл (10 ммоль) N-метилморфолина, охлаждали до -15°С и прибавляли 1,31 мл (10 ммоль) изобутилхлорформиата. Перемешивали 10 мин при -15°С и прибавляли охлажденную до той же температуры смесь 1,32 г (10,5 ммоль) HCl·H-Gly-OCH₃ в 10 мл тетрагидрофурана, содержащего 1,16 мл (10,5 ммоль) N-метилморфолина. Перемешивали 2 ч при -15°С, 1 ч при 0°С и 1 ч при 20°С. Растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в 100 мл CHCl₃, промывали 10% лимонной кислотой (3×10 мл), водой (1×10 мл), 0,5 н. NaHCO₃ (3×10 мл) и снова водой (3×10 мл), сушили безводным Na₂SO₄. Растворитель упаривали в вакууме, остаток растирали с гексаном и переосаждали из метанола эфиром. Выход 3,16 г (70%). Т. пл. 83–84°С, *R_f* 0,78 (A), 0,66 (B).

Вос-Gly-Lys(Z)-Gly-OCH₃ (XVII). 4,51 г (10 ммоль) соединения (XVI) растворяли в 15 мл 1,2 н. HCl в этилацетате и выдерживали 30 мин при 20°С. Выпавший кристаллический HCl·H-Lys(Z)-Gly-OCH₃ (XVIII) растирали с сухим эфиром, эфир отделяли декантацией. Осадок промывали эфиром и сушили. Аналогично соединению (XVI), исходя из 1,75 г (10 ммоль) Вос-Gly-OH и 3,88 г (10 ммоль) хлоргидрата (XVIII) получали соединение (XVII). Продукт переосаждали из этилацетата эфиром. Выход 4,26 г (84%). Т. пл. 86–90°С, *R_f* 0,77 (A), 0,84 (B), $[\alpha]_D^{25}$ -18° (с 0,8, CHCl₃).

Вос-Gly-Lys(Z)-Gly-OH (XIX). 5,09 г (10 ммоль) соединения (XVII) растворяли в 100 мл смеси этанол — диоксан (1:1), прибавляли 100 мл (10 ммоль) 1 н. NaOH и выдерживали 30 мин при 20°С. Затем подкисляли концентрированной лимонной кислотой до pH 5 и экстрагировали этилацетатом (3×100 мл). Этилацетатные экстракты промывали водой (2×30 мл), сушили безводным Na₂SO₄, упаривали в вакууме. Остаток растирали с гексаном и переосаждали из хлороформа эфиром. Выход соединения (XIX) 3,56 г (72%). Т. пл. 60–63°С, *R_f* 0,65 (A), 0,85 (B), $[\alpha]_D^{25}$ -6,06° (с 1,32, CHCl₃).

H-Gly-Lys(Z)-Gly-OH (XX). 4,95 г (10 ммоль) соединения (XIX) растворяли в 7 мл CF₃COOH и выдерживали 1 ч при 20°С. Продукт осаждали сухим эфиром и переосаждали из этанола эфиром. Полученный трифтороацетат обрабатывали 15 мин смолой IRA-401 в OH⁻ форме в смеси этанол — вода (1:1). Смолу отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растирали с эфиром. Выход 3,36 г (85%).

Мса-Gly-Lys-Gly-OH (XI). Смесь 0,15 г (0,54 ммоль) соединения (I) и 1 г фенола перемешивали 40 мин при 100°С. Затем прибавляли 0,21 г (0,54 ммоль) H-Gly-Lys(Z)-Gly-OH (XX) и перемешивали 3 ч при 60°С. Охлаждали до 20°С, растворяли в 100 мл CHCl₃, промывали 0,1 н. HCl (2×20 мл), водой (2×20 мл) и сушили безводным Na₂SO₄, растворитель упаривали в вакууме при 30–40°С. Остаток растворяли при нагревании в смеси этанол — хлороформ (1:1), отфильтровывали от примесей и осаждали эфиром. Выпавший ярко-желтый кристаллический продукт перекристаллизовывали из 20 мл этанола, растворяли в 5 мл 37% раствора HBr в ледяной CH₃COOH и выдерживали 2 ч при 20°С. Полученный бромгидрат осаждали абсолютным эфиром и переосаждали из смеси этанол — хлороформ (1:1) эфиром. Для удаления следов акридона (IV) вещество растирали в кипящем ацетоне (2×5 мл). После хроматографирования на колонке в системе (B) получали соединение (XI).

Мса-пептиды (XII)–(XIV) получали аналогично соединению (XI), исходя из 2-метокси-6,9-дихлоракридина (I) и соответствующих пептидов (см. табл. 2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шибнев В. А., Финогонова М. П., Газумян А. К., Поletaев А. И., Марьяш Л. И. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 5, с. 610–617.
2. Порошин К. Т., Чуваева Т. П., Шибнев В. А. Докл. АН ТаджССР, 1969, т. 12, с. 21–23.
3. Шибнев В. А., Козаренко Т. Д., Порошин К. Т. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1960, № 8, с. 1500–1506.
4. Шибнев В. А., Лазарева А. В., Финогонова М. П. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1969, № 2, с. 392–397.
5. Шибнев В. А., Гречишко В. С., Финогонова М. П., Кобяков В. В., Лобачев В. М. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 7, с. 1608–1612.
6. Марьяш Л. И., Тураев О. Д., Шибнев В. А. Химия природн. соедин., 1977, № 1, с. 87–93.
7. Марьяш Л. И., Шибнев В. А. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1972, № 8, с. 1858–1860.
8. Воробьев М. А., Черняева А. Т., Кузьмичева Т. П. Материалы по обмену передовым опытом и научными достижениями в химико-фармацевтической промышленности (ВНИХФИ). М., 1958, № 1, с. 97–101.

Поступила в редакцию
23.I.1984

ATTACHMENT OF FLUORESCENT 2-METHOXY-6-CHLOROACRIDINE GROUP TO PEPTIDES

SHIBNEV V. A., FINOGENOVA M. P., POLETAEV A. I., MARJASH L. I.*

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

**V. I. Nikitin Institute of Chemistry, Academy of Sciences
of the Tadjik SSR, Dushanbe*

2-Methoxy-6-chloroacridine-9-yl peptides (Mca-peptides) have been synthesized by reacting 2-methoxy-6,9-dichloroacridine in phenol with di- and tripeptides containing the residues of aliphatic amino acids, imino acids and lysine. Absorption spectra, as well as fluorescence excitation and emission spectra have been obtained and the quantum yields of the synthesized compounds have been determined. The spectral properties have been shown to depend on the amino acid sequence of peptides.