



УДК 547.964.4.057 : 542.95

**СИНТЕЗ ПЕПТИДНОГО СУБСТРАТА ЭНКЕФАЛИН-КОНВЕРТАЗЫ
С ПОМОЩЬЮ ТЕТРААЛКИЛАММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ АМИНОКИСЛОТ***Незавибацько В. Н.**Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва*

Описан синтез пептидного субстрата энкефалин-конвертазы с помощью тетраалкиламмониевых солей свободных аминокислот. Показано, что тетраалкиламмониевые соли могут успешно использоваться в пептидном синтезе для временного блокирования С-концевой карбоксильной группы.

Недавно Снайдером и сотр. [1] был сконструирован флуорогенный субстрат, с помощью которого была выделена и охарактеризована специфическая карбоксипептидаза из хромаффинных адреналовых гранул. Фермент, получивший название энкефалин-конвертазы, превращает триптические фрагменты высокомолекулярного пептидного предшественника в энкефалин путем отщепления С-концевых основных аминокислот. Субстрат представляет собой трипептид, который содержит расщепляемую Ala(Leu)-Arg-связь и несет флуорогенную метку, а именно дансил, на N-конце молекулы. Благодаря наличию аргинина (лизина) трипептид хорошо растворим в воде. Результатом действия энкефалин-конвертазы является образование водонерастворимого дипептида Dns-Phe-Ala, который переходит в хлороформ и поступает на измерение. Синтез субстрата авторы осуществляли реакцией сукцинимидного эфира дансилированного дипептида со свободным аргинином или же сукцинимидного эфира дансилфенилаланина с дипептидом Ala-Arg в водно-органической среде [2]. К сожалению, в цитируемых работах отсутствуют какие-либо физико-химические характеристики синтезированных субстратов.

Мы разработали схему синтеза субстрата и продукта ферментативной реакции, включающую использование четвертичных аммониевых солей свободных аминокислот (боковая группа основных аминокислот должна быть защищена), которые в большинстве случаев хорошо растворимы в неполярных растворителях и реагируют с активированными эфирами N-ациламино кислот и пептидов практически мгновенно и с высокими выходами. Первые попытки применения тетраалкиламмониевых солей в пептидном синтезе относятся к началу 60-х годов, когда Т. Виланд использовал их в качестве аминокон компонента при синтезе пептидов из неактивированных эфиров Z-аминокислот в расплаве имидазола [3]. Однако эти работы имели скорее теоретическое значение и не привели к практическим результатам. Бурное развитие теории и практики межфазного катализа и ион-парной экстракции (см., например, [4]) способствовало новым попыткам использования достижений этой области исследований в пептидном синтезе. Так, японские авторы сообщили о применении тетрабутиламмониевых солей N-защищенных аминокислот для образования пептидной связи с помощью бис(o-нитрофенил)фенилфосфоната в качестве конденсирующего агента [5]. Эти работы также не получили развития, возможно из-за некоторой экзотичности конденсирующего агента.

Наша методика предполагает использование обычных, хорошо известных в химии пептидов приемов и соединений.

Экспериментальная часть

Контроль за ходом реакций осуществляли методом ТСХ на пластинках с силикагелем марки Silufol UV-254 (ЧССР) в следующих системах растворителей: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 5 : 1 : 2 (А), этилацетат — ацетон — 50% уксусная кислота 2 : 1 : 1 (Б), хлороформ — метанол — аммиак, 6 : 4 : 1 (В), хлороформ — метанол 9 : 1 (Г). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Hitachi 220А (Япония), растворитель — этанол; удельное вращение измеряли на цифровом поляриметре А1-ЕПО (СССР).

Boc-Ala-Arg(NO₂)-OH (I). 0,4 г (2 ммоль) Arg(NO₂)-OH растворили в 5,2 мл (2 ммоль) 10% водного раствора гидроксида тетрабутиламмония. Раствор упарили, высушили повторной отгонкой спирта с бензолом и оставили на 16 ч в вакуум-эксикаторе над P₂O₅. Густой сироп растворили в 10 мл сухого CH₂Cl₂, охладили до 0° С и к раствору прибавили 0,458 г (1,5 ммоль) твердого пентафторфенилового эфира Boc-Ala. Через 5 мин осадок отделили, фильтрат упарили, остаток растворили в воде и экстрагировали эфиром. Затем водный слой подкислили и вновь экстрагировали смесью *n*-бутанол — этилацетат (1 : 1). Экстракт упарили, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (3 × 4 см), элюируя вещество в градиенте ацетона (от 30 до 50%) в гексане, содержащем 1% уксусной кислоты. Фракции, содержащие соединение (I), упаривали, остаток кристаллизовали при добавлении эфира. Выход соединения (I) 0,44 г (75%); т. пл. 160—163° С; *R_f* 0,85 (Б), 0,3 (В); [α]_D²⁰ —25,18° (с 0,4, MeOH); λ_{max} 270 нм (ε_{max} 16 500).

CF₃COOH·Ala-Arg(NO₂)(II). 0,425 г (1,1 ммоль) соединения (I) выдержали 0,5 ч в смеси трифторуксусная кислота — CH₂Cl₂(1 : 1), упарили и осадили сухим эфиром. Выход соединения (II) 0,437 г (96%); т. пл. 140—144° С, *R_f* 0,16 (А), 0,12 (Б), 0,48 (В); [α]_D²⁰ +15,5° (с 0,4, MeOH); λ_{max} 270 нм (ε_{max} 15 400).

CF₃COOH·Ala-Arg(III). 0,42 г (1,04 ммоль) соединения (II) кипятили с 3 мл циклогексадиена в 5 мл абс. этанола над 50 мг Pd-черни в течение 5 ч. Фильтровали, катализатор промыли водным этанолом, фильтрат упарили, к остатку добавили эфир. Выход соединения (III) 0,36 г (89% от теор.); *R_f* 0,07 (В).

Dns-Phe-ONSu(IV) получили по стандартной методике [6] из 1 г (2,5 ммоль) Dns-Phe, 0,35 г (3 ммоль) N-оксисукцинимид и 0,62 г (3 ммоль) дициклогексилкарбодимид. Выход соединения (IV) 1,06 г (80%), т. пл. 189—191° С, *R_f* 0,88 (Г); [α]_D²⁰ —117,6° (с 0,25, хлороформ).

Dns-Phe-Ala(V). 0,223 г (2,5 ммоль) Ala растворили в 6,5 мл (2,5 ммоль) гидроксида тетрабутиламмония, упарили в вакууме и высушили как при получении соединения (I). Соль растворили в 15 мл толуола, к раствору добавили при охлаждении льдом 0,5 г (1 ммоль) активированного эфира (IV). Через 10 мин все упарили, остаток растворили в этилацетате и промыли водой, затем водным раствором трифторуксусной кислоты до нейтральной реакции. Органический слой после высушивания над Na₂SO₄ упарили, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (3 × 4 см), элюируя соединение (V) в градиенте ацетона в гексане (от 25 до 30%). После упаривания соответствующих фракций и добавления эфира продукт затвердел. Выход соединения (V) 0,39 г (77%); т. пл. 117—120° С; *R_f* 0,88 (А), 0,95 (Б), 0,77 (В); [α]_D²⁰ —37,3° (с 0,5, MeOH); λ_{max} 251 нм (ε_{max} 15 500), 334 нм (ε_{max} 5000).

Dns-Phe-Ala-Arg(VI). К 0,359 г (1 ммоль) соединения (III) в водном ацетонитриле добавили порциями по мере расходования (контроль ТСХ в системе Б) 0,5 г (1 ммоль) соединения (IV). Для поддержания pH ~8,5 использовали триэтиламин. Через 5 ч реакционную смесь упарили, к остатку добавили ацетон. Выпавший осадок (0,24 г, 33% от теор.) растворили в 5 мл 50% этанола, перемешали с 3 мл дауэкса 50W × 8 (Pu⁺-форма), затем смесь фильтровали через 3 мл свежей порции смолы. Смолу промыли ~80 мл 50% этанола, объединенные этанольные фильтраты упарили, продукт осадили ацетоном. Выход хроматографически чистого субстрата

(VI) 0,1 г; т. пл. 175—180° С ; R_f 0,32 (А); 0,33 (Б), 0,71 (В); $[\alpha]_D^{20}$ —50° (c 0,4, MeOH); λ_{\max} 251 нм (ϵ_{\max} 13 500), 334 нм (ϵ_{\max} 4200). Еще 114 мг слегка загрязненного субстрата получают при промывании смолы 50% пиридином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fricker L. D., Snyder S. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 3886—3890.
2. Fricker L. D., Snyder S. H. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, p. 10950—10955.
3. Wieland T., Vogeler K. Lieb. Ann., 1964, v. 680, p. 125—132.
4. Вебер В., Гокель Г. Межфазный катализ в органическом синтезе. М.: Мир, 1980.
5. Mukaiyama T., Monto N., Watanabe Y. Chem. Lett., 1979, p. 1305—1308; Watanabe Y., Mukaiyama T. Chem. Lett., 1981, p. 285—288.
6. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Gallahan F. M. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, p. 1839.

Поступила в редакцию
11.VI.1985

После доработки
22.XI.1985

SYNTHESIS OF ENKEPHALIN CONVERTASE SURSTRATE USING AMINO ACID TETRAALKYLAMMONIUM SALTS

NEZAVYBAT'KO V. N.

*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the
USSR, Moscow*

Applicability of tetraalkylammonium salts for temporary blocking of C-terminal carboxyl has been demonstrated by the synthesis of an enkephalin convertase peptide substrate.