



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.962'541.6

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ
С ПОМОЩЬЮ 2-НИТРО-4-СУЛЬФОФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ

Дзюбенко П. С., Медведкин В. П., Митин Ю. В.

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.

В настоящее время осуществление твердофазного пептидного синтеза в водной среде представляет определенный интерес. Есть основания предполагать, что в водной среде за счет регулирования pH реакционной смеси можно достичь селективного ацилирования аминогрупп в присутствии незащищенных гидроксильных и карбоксильных групп, а также имидазольных групп гистидина и гуанидиновых групп аргинина. Это облегчит окончательное деблокирование пептида на последней стадии синтеза и, возможно, позволит свести к минимуму известное нежелательное явление — образование β -структур полипептидными цепями в процессе синтеза. Применение водорастворимых реагентов в перспективе может привести к созданию более дешевой и экологически чистой технологии пептидного синтеза.

Целью настоящей работы является изучение возможности осуществления твердофазного пептидного синтеза в водной среде с использованием водорастворимых активированных эфиров N-защищенных аминокислот.

Для проведения синтеза в качестве полимерного носителя нами был выбран хорошо набухающий в воде сефадекс LH-20, ранее использованный для твердофазного пептидного синтеза в органической среде [1].

Присоединение первой аминокислоты к сефадексу LH-20 проводили прямой этерификацией N-защищенной аминокислоты гидроксильными группами сефадекса с помощью диметилглиоксилькарбодиимида в присутствии 4-диметиламинопиридина в смеси пиридин — хлористый метилен, 1 : 1. По нашим данным, в этих условиях этерификация проходит с максимальным выходом. Первая аминокислота, присоединяемая к сефадексу, была помечена ^{14}C , что позволило контролировать ее посадку на носитель и полную снятия с носителя синтезированного пептида с помощью радиоактивной метки.

Для образования пептидной связи использовали водорастворимые активированные 2-нитро-4-сульфофениловые (Nsp) эфиры Вос-аминокислот [2].

Определены оптимальные условия для реакции образования пептидной связи. Нами установлено, что нежелательный вклад гидролиза Nsp-эфира при ацилировании аминогрупп минимален при pH 7–9. Поскольку в ходе реакции выделяется кислый фенол, необходимо постоянно поддерживать значение pH реакционной смеси в диапазоне 7–9. Применение для этих целей неорганических солевых буферов нецелесообразно, так как сефадекс LH-20 в их присутствии плохо набухает, что приводит к резкому снижению эффективности N-ацилирования. Поэтому для реакции использован 2 M водный пиридин, в котором сефадекс LH-20 набухает несколько лучше, чем в чистой воде. Если при этом в реакционную смесь добавлять додецилсульфат натрия (SDS), то N-ацилирование становится еще более эффективным. Так, при обработке глицил-сефадекса (1,1 ммоль Gly/g) 2 эквивалентами Вос-Leu-ONsp в 0,4 M NaHCO_3 75% аминогрупп остаются непрореагировавшими. В 2 M пиридине их остается 13%, а при проведении той же реакции в 2 M пиридине в присутствии 1% SDS —

только 7,5%. Время одной обработки полимера активированным эфиром — 5—7 ч. Количественное определение свободных аминогрупп осуществляли с помощью пикринового теста [3].

Как правило, при одной обработке аминоацил-полимера двукратным избытком Nsp-эфира N-ацилирование до конца не доходит. Повторная обработка небольшими избытками активированного эфира дает более высокий выход N-ацилирования по сравнению с однократной обработкой большим избытком активированного эфира.

В этих условиях (2 М пиридин, 1% SDS) был синтезирован меланостатин Pro-Leu-Gly-NH₂. Деблокирование проводили 50% трифторуксусной кислотой в хлористом метиле. Дипептидил-полимер был получен двукратной обработкой аминоацил-полимера 2 эквивалентами активированного эфира. На стадии образования трипептида полное N-ацилирование было достигнуто двукратной обработкой дипептидил-полимера 2 эквивалентами и последующей однократной обработкой 1 эквивалентом активированного эфира. После каждой обработки полимер промывали 3 раза спиртом, поочередно водой и 10% раствором Na₂CO₃, далее промывали водой, спиртом и высушивали полимер.

Образующийся при N-ацилировании 2-нитро-4-сульфофенол (HONsp) может неспецифически сорбироваться на сефадексе LH-20. В этом случае для удаления HONsp с носителя удобно использовать 5% триэтиламин в 50% водном спирте или в 50% водном диметилформамиде.

Для сравнения проведен синтез этого же трипептида на полимерном носителе «Merrifield Polymer Fluka» (2% дивинилбензола, 3,5 ммоль Cl/г, Fluka, Швеция) с нагрузкой Boc-Gly 0,5 ммоль/г в диметилформамиде с помощью симметричных ангидридов. На оба синтеза израсходовано примерно одинаковое количество Boc-аминокислот.

Наличие непрореагировавших аминогрупп после каждой обработки полимера активированным эфиром в описанных синтезах определяли с помощью качественного хлорантлового теста [4].

Пептид с носителя в обоих случаях снимали, пропуская аммиак через суспензию пептидил-полимера в метаноле. Выход этой реакции количественный. По данным тонкослойной хроматографии, полученные неочищенные образцы пептидов по характеру и количеству примесей практически не различались. Выходы пептидов после очистки адсорбционной колоночной хроматографией на силикагеле (элюент — хлороформ) составляли 94—95%.

Таким образом, показано, что твердофазный синтез пептидов в водной среде с помощью активированных Nsp-эфиров пригоден для получения пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов Г. П., Гусель В. А., Кожевникова Н. Ю., Дитковская И. Б., Дорош М. Ю., Красникова Е. Н., Москвичева Ю. Б., Кулыба О. П., Титов А. П., Качурин Г. П. // Журн. общей химии. 1986. Т. 56. № 7. С. 1635—1641.
2. Гершкович А. А., Серебряный С. Б. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 8. С. 1125—1132.
3. Калей У. О., Подгорнова Н. Н., Власов Г. П. Способ определения содержания свободных аминогрупп в пептидил-полимере при твердофазном синтезе пептидов. А. с. 1084271 СССР // Б. И. 1984. № 13. С. 67.
4. Christensen T. // Acta chem. scand. 1979. В. 33. № 10. Р. 769—766.

Поступило в редакцию 4.XI.1988

SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS IN AQUEOUS MEDIUM USING 2-NITRO-4-SULPHOPHENYL ESTERS

DZUBENKO P. S., MEDVEDKIN V. N., MITIN Yu. V.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino, Moscow Region*

2-Nitro-4-sulphophenyl (Nsp) esters of Boc-amino acids were used for solid-phase peptide synthesis in aqueous solution. A tripeptide melanostatin was synthesized on Sephadex LH-20 with satisfactory yield and purity. 1% sodium dodecylsulphate in 2 M aqueous pyridine proved to be optimal medium for aminolysis of Nsp-esters in the solid-phase synthesis.