



УДК 547.455.9.057

СПОНТАННАЯ И ПРОМОТИРОВАННАЯ АССОЦИАЦИЯ ЛИНЕЙНЫХ ОЛИГОГЛИЦИНОВ

© 2006 г. И. В. Горохова, А. А. Чинарев, А. Б. Тузиков, С. В. Цыганкова, Н. В. Бовин*

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 05.12.2005 г. Принята к печати 06.03.2006 г.

Синтезированы линейные олигоглицины разной длины с карбоксильной либо амидной группой на С-конце, а также их полиакриламидные конъюгаты. Для свободных олигоглицинов $\text{H}-(\text{Gly})_m-\text{OH}$ ($m = 3-5$) не наблюдалось самосборки в супрамолекулярные конструкции. В то же время олигоглициламида $\text{H}-(\text{Gly})_m-\text{NH}_2$ ($m = 3-5$) продемонстрировали способность как к самоассоциации в водном растворе, так и к ассоциации, промотированной дополнительным взаимодействием с поверхностью. Для полимерсвязанных олигоглицинов (и их амидов) ожидаемой внутримолекулярной кластеризации пептидных цепей не наблюдалось, так что наличие нескольких олигоглициновых цепей, связанных между собой в одном центре, не является обязательным условием ассоциации по типу “полиглицин-II”.

Ключевые слова: пептиды, самосборка, полиглицин-II, полиакриламидные конъюгаты.

ВВЕДЕНИЕ

В 1950-е годы было найдено, что в одной из кристаллических форм полимера глицина, так называемом полиглицине-II (PGII), спиральные полипептидные цепи упакованы в неканоническую структуру, в которой все водородные связи являются межцепными и направлены перпендикулярно оси цепей, причем каждая полипептидная цепь окружена шестью другими (рис. 1) [1, 2]. Упаковка цепей в PGII настолько плотная, что подобной структуры не могут быть образованы ни одной другой α -аминокислотой, включая аланин. Впоследствии, упаковка, аналогичная PGII, была обнаружена в кристаллических найлонах, т.е. полимерах, построенных из остатков ω -аминокислот, либо органических дикислот и диаминов [3, 4]. Известно, что некоторые относительно короткие олигоглициновые пептиды ряда $\text{R}(\text{NHCH}_2\text{CO})_m\text{R}'$ способны к образованию двумерных кристаллов со структурой PGII (рис. 1а) [5–7]. Также было описано образование в твердой фазе структуры PGII болаамфилами, имеющими в своем составе олигоглициновые фрагменты [8].

Недавно мы синтезировали симметричные разветвленные молекулы, в которых четыре одинаковых олигоглициновых фрагмента соединены

в одном центре (четыреантенные олигоглицины, рис. 2а) и продемонстрировали их способность упаковываться по типу PGII не только в твердой фазе, но и в водных растворах [9]. Ассоциаты, образованные такими олигоглициновыми тектонами (от греческого $\tau\epsilon\chi\tau\omicron\nu$ – строительный блок [10]), получили название тектомеров [9]. Четыреантенные олигоглицины формируют тектомеры, когда количество глицинов в антенне равно семи или более, в этом случае кооперативность системы водородных связей оказывается настолько высокой, что вода не способна ее разрушить при комнатной температуре. При повышении температуры до 60–70°C наблюдается обратимый распад растворенных тектомеров; к диссоциации приводит также протонирование терминальных аминогрупп или введение в раствор хаотропных агентов, таких, как хлорид лития, подавляющих образование водородных связей [9]. Далее было показано, что плоские тектомеры со структурой PGII могут образовываться не только из четырехантенных тектонов, но также из трехантенных (рис. 2б) и некоторых двухантенных олигоглицинов (рис. 2б). В случае если сборка разветвленных олигоглицинов промотируется поверхностью, образуются протяженные тектомерные слои со структурой PGII, причем процесс сборки протекает значительно быстрее, чем в водных растворах [11].

Приведенные выше данные давали основание предположить, что “антенная” архитектура олигоглицинов является фактором, способствующим их ассоциации. В этой связи представлялось инте-

Сокращения: Вос – трет-бутилоксикарбонил; EA – этаноламин; PHEAA – поли(2-гидроксиэтилакриламид); ONp – 4-нитрофениловый эфир; PGII – полиглицин-II; PNPA – поли(4-нитрофенилакрилат); АСМ – атомно-силовая микроскопия.

*Автор для связи (тел.: (495) 330-71-38; эл. почта: bovin@carb.ibch.ru).

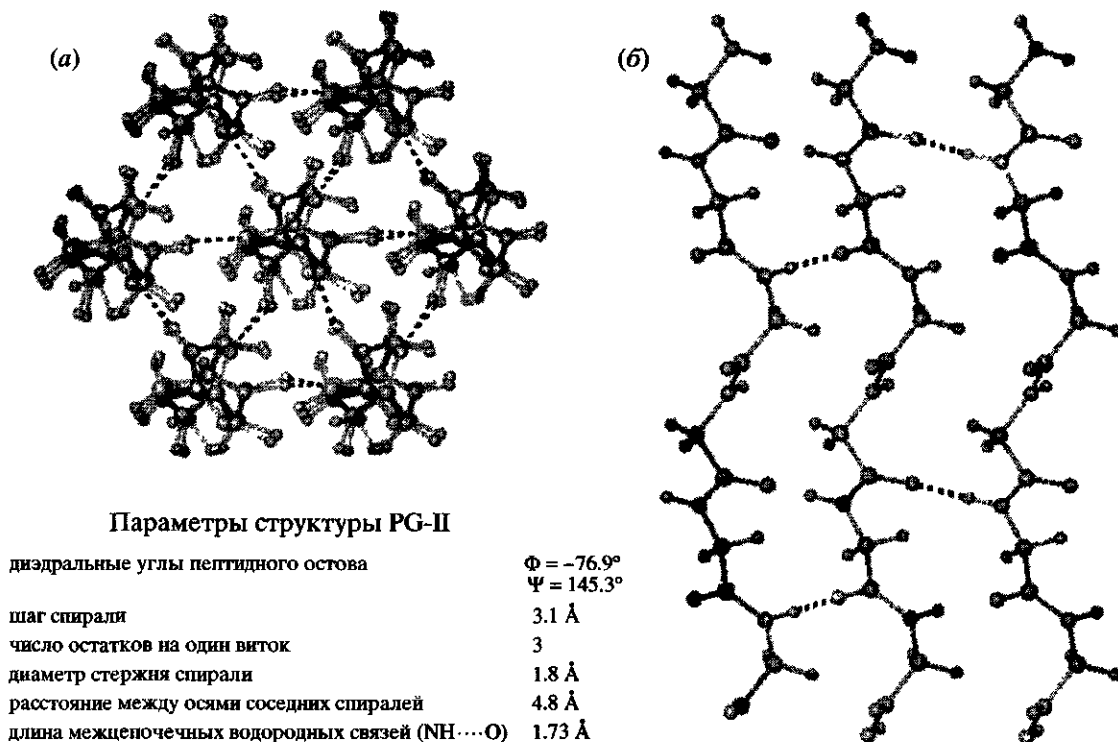


Рис. 1. Модель структуры полиглицина-II. (а) вид сверху. (б) вид сбоку. Показаны только три цепи. Водородные связи показаны прерывистыми линиями.

ресным синтезировать полимерные конъюгаты линейных олигоглицинов и сравнить их способность к самосборке с таковой для неконъюгированных пептидов. Мы предполагали, что сближенность олигоглициновых антенн и их связанность с полимером-носителем будет энтропийно способствовать ассоциации (см. рис. 2д).

Олигоглициновые фрагменты, до гексаглицина, встречаются в некоторых белках, в частности в структурных белках клеточных стенок растений, содержание глицина в которых достигает 60% [12, 13]. Эти белки обладают уникальной способностью в ответ на микробную атаку или механическое повреждение стенок клетки организовываться в суперспиральные структуры, тем самым, снабжая клеточную ткань гибкими и прочными на разрыв волокнами как строительным материалом. Данных о том, способны ли белки этой группы ассоциировать благодаря наличию олигоглицинового фрагмента, в литературе нет. В этой связи, мы рассматривали полимерные производные олигоглицинов (см. выше) в качестве моделей, в которых так же, как в упомянутых белках, присутствует несколько олигоглициновых участков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пептиды

Методом активированных эфиров было получено два ряда олигоглициновых пептидов, а именно – с карбоксильной и с амидной группой на С-конце. Олигомеры получали последовательным наращиванием пептидной цепи по N-концу с помощью сукцинимидного эфира N-Вос-глицина. В качестве исходных соединений использовали глицилглицин или глициламид соответственно (см. схему 1а).

Ряд признаков указывает на способность к самоорганизации олигоглицинамидов. В частности, очень низкая растворимость Вос-производных пептидов ($m = 6-8$) в апротонных полярных растворителях (DMF, DMSO), пониженная растворимость соответствующих трифторацетатов ($m = 7, 8$) в воде и уширение линий в их спектрах ЯМР ($m = 7, 8$), а также то, что практически нерастворимые в воде пептиды с непротонированной аминогруппой $\text{H}-(\text{Gly})_m-\text{NH}_2$ ($m = 7, 8$) растворяются в насыщенном водном растворе LiCl (который разрушает водородные связи), – свойства, наблюдавшиеся ранее для ассоциирующих четырехантенных пептидов [9]. Пептиды со свободной карбоксильной группой $\text{H}-(\text{Gly})_m-\text{OH}$ ($m = 4, 5$) описанными выше свойствами не обладают. По-видимому, электростатическое отталкивание кон-

цевых COO-групп, а также меньшая длина пептидных цепей препятствуют их ассоциации.

Прямым методом оценки размера макромолекул, супрамолекул и частиц является динамическое светорассеяние [14]. Этим методом было продемонстрировано, что наблюдаемый размер объектов, находящихся в водном растворе $\text{HCl} \times \text{H}-(\text{Gly})_m-\text{OH}$, не зависит от длины пептида (величины m), хотя во времени (сутки и более) несколько возрастает. Добавление LiCl к раствору пептида не влияет на размер объектов, находящихся в растворе (табл. 1). Это указывает на отсутствие ассоциации в растворах $\text{HCl} \times \text{H}-(\text{Gly})_m-\text{OH}$ ($m = 3-5$). В то же время для амидов $\text{TFA} \times \text{H}-(\text{Gly})_m-\text{NH}_2$ ($m = 3-5$) данные светорассеяния интерпретируются как резкое увеличение размеров растворенных частиц через сутки после добавления основания (максимумы кривых распределения соответствуют размеру 2–7 мкм), более того, наблюдается опалесценция раствора. Добавление LiCl или HCl , которые, как показано ранее [9], разрушают четырехантенные тектомеры, привело к уменьшению размера частиц и исчезновению опалесценции. Суммарно приведенные наблюдения указывают на ассоциацию линейных олигоглицинамидов $\text{H}-(\text{Gly})_m-\text{NH}_2$ ($m = 3-5$) в водных растворах. Это заключение находится в соответствии с литературными данными о том, что в ряду олигомеров $\text{Ac}-(\text{Gly})_m-\text{NHC}_2\text{H}_5$ упорядоченная структура с упаковкой PGII возникает, начиная уже с диамида ($m = 1$) [5].

Ассоциаты, формирующиеся из $\text{H}-(\text{Gly})_m-\text{NH}_2$ ($m = 3, 4$), были изучены также с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для этого к раствору соответствующего трифторацетата прибавляли NaHCO_3 , и сразу наносили образец на слюду. Согласно данным АСМ, для ассоциатов характерны планарные размеры, варьирующие в интервале 50–1000 нм, и высота 2.0 нм (триглициламид, рис. 3) или 2.5 нм в случае тетраглициламида (данные не показаны), то есть их организация аналогична организации тектомеров, формирующихся из четырех- [9], трех- и двухантенных [11] олигоглицинов. В обоих случаях высота ассоциата соответствует удвоенной длине пептида в конформации PGII. Таким образом, можно предположить, что ассоциаты являются двухслойными структурами. По-видимому, поверхность слюды, обладающая слабым отрицательным зарядом, способствует образованию пептидного двумерного кристалла PGII за счет взаимодействия с аминогруппами пептидов, как это наблюдалось для антенных олигоглицинов [11]. Действительно ли ассоциат построен как PGII и каким образом второй слой связан с первым, будет показано в дальнейшем методами колебательной спектроскопии.

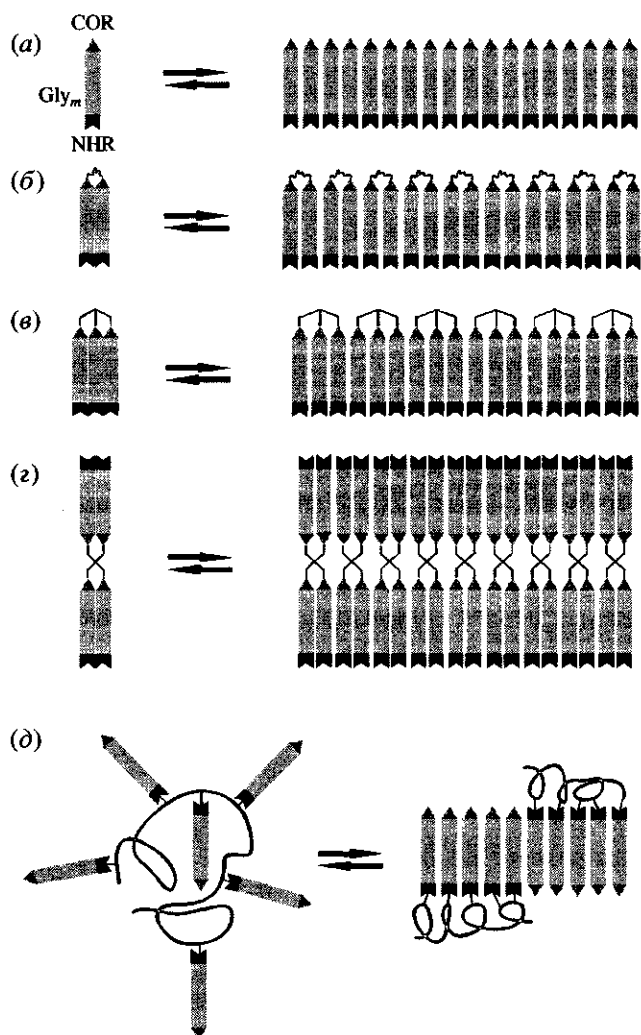
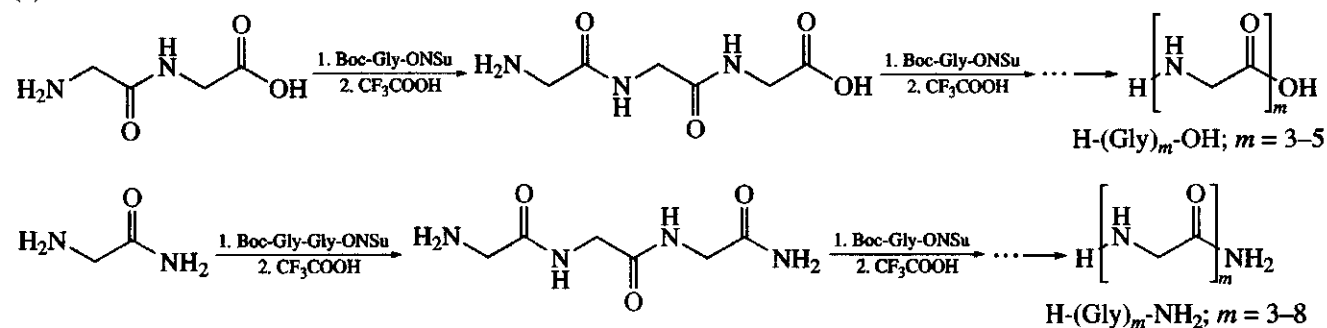


Рис. 2. Схематическое изображение ассоциации олигоглицинов. (а) сборка плоского кристаллического монослоя из линейного пептида. (б) сборка двухантенного пептида, в котором олигоглициновые фрагменты соединены углеводородным мостиком. (в) сборка трехантенного пептида (монослой, все три антенны направлены в одну сторону). (г) сборка четырехантенного пептида (две антенны направлены в одну сторону, а две другие – в противоположную). (д) предполагаемая сборка пептидного кластера, когда линейные олигоглицины соединены гибким полимером.

Полимерные конъюгаты пептидов

Полимерные конъюгаты были получены конденсацией олигоглицинов с PNPA, с последующим амидированием непрореагировавших $-\text{COONp}$ -групп этаноламином (схема 1б) [3]. Были сделаны попытки получить конъюгаты со степенью замещения олигоглицинами в интервале от 5 до 50 мол. %. Включение олигоглицинов в состав полимера было продемонстрировано с помощью ^{13}C -ЯМР. Однако данные аминокислотного анализа свидетельствуют, что даже для коротких

(a)



(б)

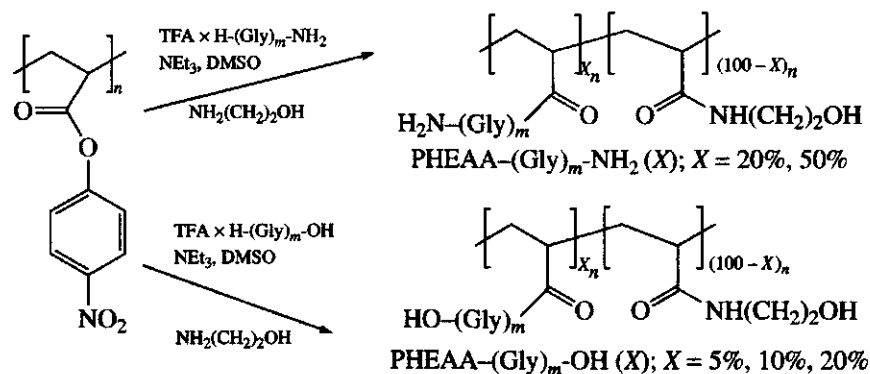


Схема 1. Схема синтеза линейных олигоглицинов и олигоглицинамидов (а) и их полимерных конъюгатов (б).

пептидов ($m = 3$) не удалось получить конъюгаты со степенью присоединения олигоглицинов к полимеру выше 30 мол. %. Так, реальное содержа-

Таблица 1. Размеры частиц олигоглицинов $\text{H}-(\text{Gly})_m-\text{OH}$ и конъюгатов $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_m-\text{OH}$, согласно данным светорассеяния

Соединение	Размер частиц, нм*		
	Свеже-приготовленный раствор в воде	Раствор через 24 ч	
		вода	5 M LiCl
$\text{HCl} \times \text{H}-(\text{Gly})_3-\text{OH}$	400	1030	830
$\text{HCl} \times \text{H}-(\text{Gly})_4-\text{OH}$	330	1550	1440
$\text{HCl} \times \text{H}-(\text{Gly})_5-\text{OH}$	500	1350	1280
$\text{PHEAA}-(\text{Gly})_3-\text{OH} (5)$	980	620	1160
$\text{PHEAA}-(\text{Gly})_3-\text{OH} (10)$	970	670	1060
$\text{PHEAA}-(\text{Gly})_3-\text{OH} (20)$	430	530	980
$\text{PHEAA}-(\text{Gly})_4-\text{OH} (5)$	580	570	870
$\text{PHEAA}-(\text{Gly})_4-\text{OH} (10)$	810	610	960
$\text{PHEAA}-(\text{Gly})_4-\text{OH} (20)$	670	620	1110
$\text{PHEAA}-(\text{Gly})_5-\text{OH} (10)$	780	630	990
PHEAA	530	370	2480

* Приведены значения, соответствующие максимуму кривой распределения частиц по размеру.

ние глицина в $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_3-\text{NH}_2 (20)^*$ составляет 18 мол. %, а в случае $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_3-\text{NH}_2 (50)$ – только 33 мол. %, в то время как для широкого круга молекул с первичной аминогруппой ранее наблюдалась количественная степень присоединения к PNPA [15].

Необходимо отметить возможность того, что после присоединения олигоглицина к PNPA, остающиеся в составе полимера активированные карбоксильные группы взаимодействуют с NH-группами пептидов, приводя к образованию *N*-диацильных аддуктов [16]. При ацилировании NH-группы, через которую пептид присоединен к полимеру, могут получаться шестичленные циклические дикетоперидиновые структуры. Кроме того, можно предположить образование аддуктов, как результат ацилирования одной или нескольких амидных NH-групп внутри пептидной цепи; если такой процесс действительно идет, то при последующем взаимодействии с этаноламином далее должно происходить укорачивание пептида, как показано на схеме 2, как следствие, содержание Gly в конъюгате оказывается ниже ожидаемого.

Чтобы избежать упомянутых выше побочных процессов, мы изменили порядок прибавления

* $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_m-\text{OH} (X)$, $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_m-\text{NH}_2 (X)$ – условное обозначение конъюгатов поли(2-гидроксиэтилакриламид)-олигопептид; X ожидаемая – степень замещения 2-гидроксиэтильных групп на пептидные, мол. %.

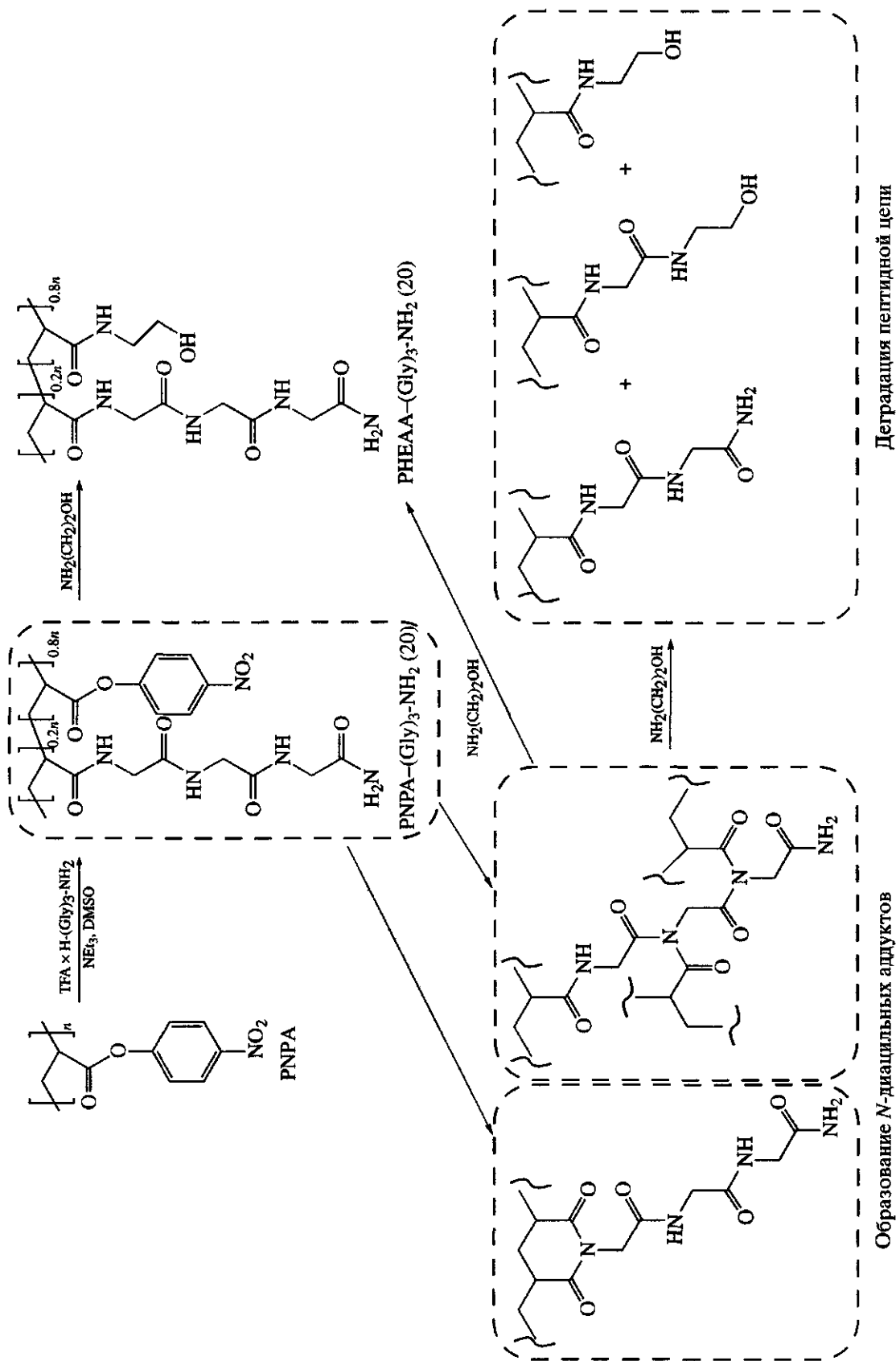


Схема 2. Предлагаемые побочные процессы при синтезе полимерных конъюгатов олигоглицинов.

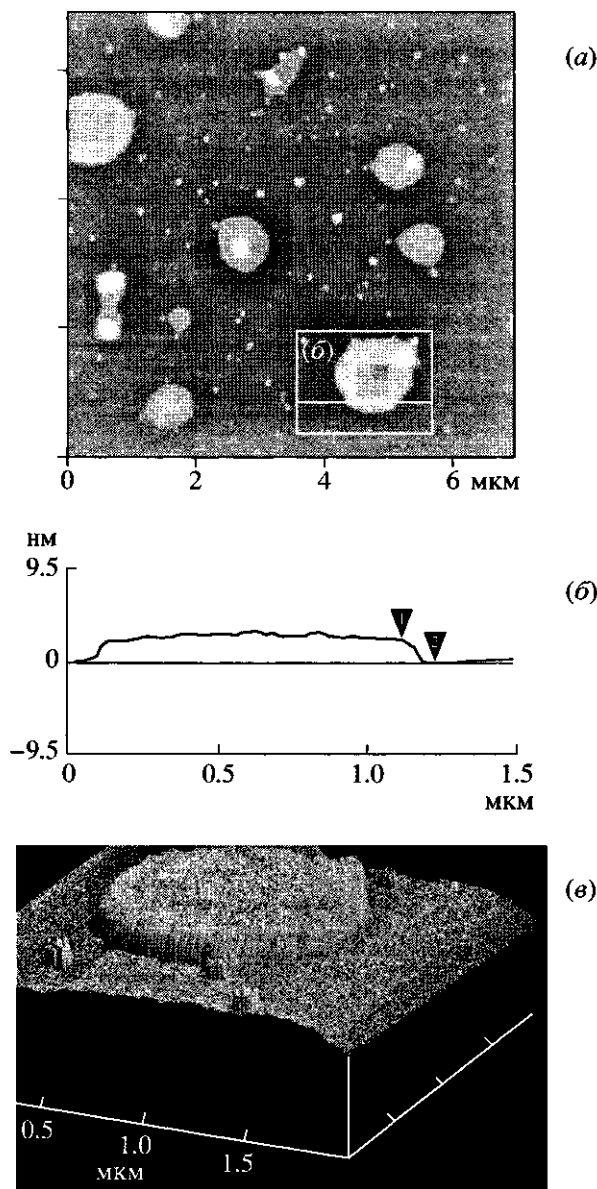


Рис. 3. АСМ-изображение агрегатов, образованных триглицинамидом на поверхности слюды (а); поперечное сечение агрегата (расстояние 1–2 составляет 2,0 нм) (б); 3D-изображение агрегата (в).

реагентов в процессе синтеза конъюгатов. А именно, на первой стадии 30–80% *n*-нитрофенильных групп в PNPA замещали этаноламином, а $\text{N}-(\text{Gly})_3\text{-NH}_2$ в реакцию вводили на второй стадии. Однако в этом случае связывания полимера с пептидом не происходило вовсе. Другой способ избежать описанных выше побочных реакций – это *de novo*-синтез полиакриламидной цепи, то есть получение *N*-акрилоилового производного пептида с последующей его радикальной полимеризацией. Однако полимеризация *N*-акрилоилолигоглицинамидов не проходила ни в растворе

(а) DMSO под действием 2,2'-азо-бис-изо-бутиронитрила, ни в смеси $\text{H}_2\text{O}/i\text{PrOH}$ под действием персульфата калия. Также не удалось провести сополимеризацию *N*-акрилоилолигоглицинамидов с акриламидом, хотя другие, акрилоильные мономеры в этих условиях легко полимеризовались [15].

Так как попытки синтезировать полимерные конъюгаты олигоглицинов не привели к “идеальной” целевой структуре $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_m\text{-NH}_2$ (20) (схема 2), ассоциацию изучали на частично деградированном конъюгате, предполагаемая структура которого изображена на схеме 2. С помощью аналитической гель-хроматографии было показано, что значения времени выхода для полимерных конъюгатов олигоглицинов не отличаются от таковых для поли(2-гидроксиэтилакриламида), PHEAA, полученного путем модификации PNPA этаноламином. Это свидетельствует об отсутствии ассоциации пептидов в составе синтезированных конъюгатов.

(б) Ассоциацию пептидных цепей в составе полимерного конъюгата изучали также методом светорассеяния (табл. 1 и 2). Для свежеприготовленных растворов $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_m\text{-OH}$ и $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_m\text{-NH}_2$ были получены кривые распределения по размерам, которые оказались широкими, с максимумом <1000 нм. В сравнении со свежеприготовленными, растворы, хранившиеся в течение 24 ч при комнатной температуре, показали более узкие кривые распределения, а максимум этого распределения соответствовал размеру 400–700 нм. При добавлении к такому раствору хлорида лития, т. е. агента, подавляющего ассоциацию, кривая распределения изменялась в сторону увеличения размера частиц. Однако в контрольных опытах водный раствор PHEAA продемонстрировал такое же поведение, то есть наблюдалось действие соли на полимер-носитель, а не на пептидные цепи.

(в) Таким образом, эксперименты по светорассеянию также свидетельствуют об отсутствии ассоциации олигоглицинов в составе $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_m\text{-OH}$ и $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_m\text{-NH}_2$. Как можно объяснить наличие ассоциации даже коротких ($m = 3\text{--}5$) свободных олигоглицинамидов и в то же время отсутствие ассоциации таких же или даже более длинных пептидов в составе полимера? Во-первых, в составе одной молекулы конъюгата находится всего лишь несколько десятков олигоглициновых цепей (около сорока для $\text{PHEAA}-(\text{Gly})_m\text{-OH}$ (20)), этого количества может оказаться недостаточным для формирования устойчивого кластера пептидов, – в ранее изученных тектомерах число составляющих его тектонов было на несколько порядков больше (монослойный тектомер с диаметром 50 нм содержит ~6000 олигоглициновых цепей) [9]. Во-вторых, динамика ассоциации полимерсвязанных цепей, по-видимому, неблаго-

Таблица 2. Размеры частиц олигоглицинов $\text{H-(Gly)}_m\text{-NH}_2$ и конъюгатов $\text{PHEAA-Gly}_m\text{-NH}_2$, согласно данным светорассеяния

Соединение	Размер частиц, нм*				
	Свежеприготовленный раствор в воде	Раствор через 24 ч			
		вода	5 M LiCl	1 M NaHCO_3	1 M HCl
$\text{TFA} \times \text{H-(Gly)}_3\text{-NH}_2$	591	1440	1230	4480	486
$\text{TFA} \times \text{H-(Gly)}_4\text{-NH}_2$	2320	3600	2230	4150	2200
$\text{TFA} \times \text{H-(Gly)}_5\text{-NH}_2$	4460	7890	2680	7850	2540
$\text{PHEAA-(Gly)}_3\text{-NH}_2$ (20)	710	450	780		
$\text{PHEAA-(Gly)}_4\text{-NH}_2$ (20)	950	370	1390		
$\text{PHEAA-(Gly)}_5\text{-NH}_2$ (20)	380	330	710		
$\text{PHEAA-(Gly)}_6\text{-NH}_2$ (20)	380	450	640		
$\text{PHEAA-(Gly)}_7\text{-NH}_2$ (20)	700	330	650		
$\text{PHEAA-(Gly)}_8\text{-NH}_2$ (20)	523	510	840		

* Приведены значения, соответствующие максимуму кривой распределения частиц по размеру.

приятна, – диффузия следующих цепей к начальному зародышу недостаточно быстра, и поэтому зародыш критического (гарантирующего необратимость формирования ассоциата) размера не в состоянии образоваться. Наконец, энтропийный фактор: образование кластера пептидов должно приводить к уменьшению степеней свободы полиакриламидной цепи, которая в обычном состоянии является гибкой; по-видимому, эта энтропийная потеря не компенсируется выигрышем энергии за счет “кристаллизации” пептидного кластера.

Таким образом, даже такие небольшие олигоглицины, как $\text{H-(Gly)}_m\text{-NH}_2$ ($m = 3-5$) способны к самоассоциации в водном растворе, а также к ассоциации, промотированной дополнительным взаимодействием с поверхностью. Более того, наличие нескольких (двух, трех, четырех) пептидных цепей, связанных между собой в одном центре, не является обязательным условием ассоциации. Ассоциация – равновесный процесс, и в случае небольших пептидов равновесие, по-видимому, сильно сминуто в сторону мономеров. В то же время, когда длина цепи достигает семи глицинов [10], кооперативность процесса настолько возрастает, что равновесие между мономером и тектомером почти нацело сдвигается в сторону супрамолекулярного соединения, – за счет его обособления в отдельную фазу или выгодного (гидрофобного, полярного, биоспецифического) связывания с поверхностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы и растворители фирмы “Merck” (Германия), за исключением Woc-Gly-ONSu , Woc-Gly-Gly-ONSu и PNPA , кото-

рые были синтезированы согласно методикам приведенных в публикациях [17, 18] соответственно. Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60 (Merck, Германия), для гель-хроматографии – сефадекс LH-20 (Pharmacia Bio-Tech, Австрия). ТСХ проводили на пластинках из фольги, покрытых слоем Kieselgel 60 (Merck, Германия).

$^1\text{H-NMR}$ -спектры синтезированных соединений регистрировали на спектрометре WM-500 “Bruker” (США) при температуре 303 К (калибровка по остаточным протонам: $\text{DMSO-}d_6$, $\delta = 2.500-2.50$ м.д.; D_2O , $\delta = 4.75$ м.д.). Масс-спектры регистрировали на времяпролетном спектрометре Vision-2000 (Thermo Bioanalysis Corp., Англия) с лазерной ионизацией образца с поверхности матрицы (MALDI), в качестве которой использовали 2,6-дигидроксibenзойную кислоту.

Аминокислотный анализ полимерных конъюгатов олигоглицинов проводили с помощью анализатора LC 300 (Biotronik, Германия), снабженного колонкой BTC 2410, 1×125 мм (Biotronik, Германия) согласно методике [19].

N-(трет-Бутилоксикарбонил)олигоглицины (*Woc*-(Gly)_m-OH)

$\text{Woc-(Gly)}_3\text{-OH}$. К раствору, содержащему 6.54 г (50 ммоль) H-Gly-Gly-OH в 25 мл DMSO , прибавили 14.8 г (55 ммоль) Woc-Gly-ONSu . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч, DMSO удаляли лиофилизацией, остаток хроматографировали на силикагеле, элюция – $i\text{PrOH-EtOAc-H}_2\text{O-AcOH}$, 7 : 10 : 1 : 0.1. Выход $\text{Woc-(Gly)}_3\text{-OH}$ 7.15 г (50%), т. пл. 205°C; ТСХ: $i\text{PrOH-EtOAc-H}_2\text{O}$, 4 : 3 : 2, R_f 0.28; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 8.085, 7.394, 6.983 (1 H, 3 т, 3 × NH),

3.686, 3.573 (2 Н, 2 д, ^{NH}J 5.8 Гц, $2 \times CH_2$ Gly), 3.344 (2 Н, уш. с, CH_2 Gly³), 1.381 (9 Н, с, $C(CH_3)_3$); MALDI-MS: 313 ($M + Na$)⁺, 329 ($M + K$)⁺.

Вос-(Gly)₄-ОН получен по описанной выше методике исходя из $HCl \times H-(Gly)_3-OH$. Выход 46%, т. пл. >220°C (с разл.); ТСХ: $iPrOH-EtOAc-H_2O$, 4 : 3 : 2, R_f 0.22; 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 8.290, 8.206, 7.365, 7.024 (1 Н, 4 т, $4 \times NH$), 3.745, 3.680, 3.592 (2 Н, 3 д, ^{NH}J 5.8 Гц, $3 \times CH_2$ Gly), 3.346 (2 Н, уш. с, CH_2 Gly⁴), 1.381 (9 Н, с, $C(CH_3)_3$); MALDI-MS: 370 ($M + Na$)⁺, 386 ($M + K$)⁺.

Вос-(Gly)₅-ОН получен по описанной выше методике исходя из $HCl \times H-(Gly)_4-OH$. Выход 20%, т. пл. >250°C (с разл.); ТСХ: $iPrOH-EtOAc-H_2O$, 4 : 3 : 2, R_f 0.15; 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 8.290, 8.115, 8.063, 8.022, 6.979 (1 Н, 5 т, $5 \times NH$), 3.750–3.725 (6 Н, м, $3 \times CH_2$ Gly), 3.582 (2 Н, д, ^{NH}J 5.8 Гц, CH_2 Gly²), 3.346 (2 Н, уш. с, CH_2 Gly⁵), 1.381 (9 Н, с, $C(CH_3)_3$); MALDI-MS: 427 ($M + Na$)⁺, 443 ($M + K$)⁺. Найдено, %: С 44.38, Н 6.28, N 17.29. $C_{15}H_{25}N_5O_8$. Вычислено, %: С 44.66, Н 6.25, N 17.36.

Синтез гидрохлоридов олигоглицинов $HCl \times H-(Gly)_m-OH$. Общий метод. К 1 г Вос-(Gly)_m-ОН прибавили 5 мл CF_3COOH , реакционную смесь выдержали 2 ч при комнатной температуре и соупарили с 20 мл толуола. Остаток растворили в 20 мл 1 М HCl , раствор упарили досуха, остаток высушили в вакууме. Выходы $HCl \times H-(Gly)_m-OH$ составляли 90–95%.

$HCl \times H-(Gly)_3-OH$: т. пл. 240°C (с разл.), для $H-(Gly)_3-OH$ т. пл. 215°C [20]; ТСХ: $EtOAc-Py-AcOH-H_2O$, 3 : 1 : 1 : 1, R_f 0.38; 1H -ЯМР (D_2O): 4.079, 4.040, 3.920 (2 Н, 3 с, $3 \times CH_2$ Gly); MALDI-MS: 189 (M)⁺, 212 ($M + Na$)⁺, 228 ($M + K$)⁺.

$HCl \times H-(Gly)_4-OH$: т. пл. >300°C (с разл.), для $H-(Gly)_4-OH$ т. пл. 220°C [20]; ТСХ: $EtOAc-Py-AcOH-H_2O$, 3 : 1 : 1 : 1, R_f 0.36; 1H -ЯМР (D_2O): 4.080, 4.031, 4.025, 3.925 (2 Н, 4 с, $4 \times CH_2$ Gly); MALDI-MS: 246 (M)⁺, 269 ($M + Na$)⁺, 285 ($M + K$)⁺.

$HCl \times H-(Gly)_5-OH$: т. пл. >300°C (с разл.), для $H-(Gly)_5-OH$ т. пл. 240°C [20]; ТСХ: $EtOAc-Py-AcOH-H_2O$, 3 : 1 : 1 : 1, R_f 0.35; 1H -ЯМР (D_2O): 4.087, 4.034, 4.024, 4.016, 3.927 (2 Н, 5 с, $5 \times CH_2$ Gly); MALDI-MS: 303 (M)⁺, 326 ($M + Na$)⁺, 342 ($M + K$)⁺.

Синтез *N*-(трет-бутилоксикарбонил)олигоглицинамидов (Вос-(Gly)_m-NH₂)

Вос-(Gly)₃-NH₂. К раствору, содержащему 5.5 г (50 ммоль) $HCl \times NH_2CH_2CONH_2$ в 40 мл DMSO, прибавили 7.9 мл (55 ммоль) NEt_3 и 18.1 г (55 ммоль) Вос-Gly-Gly-ONSu. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч, DMSO удалили лиофилизацией, остаток хроматографировали на силикагеле, элюция – $CHCl_3-MeOH-H_2O$, 32 : 8 : 1. Выход Вос-(Gly)₃-NH₂ составил 11.7 г (82%); т. пл. 215°C; ТСХ: $CHCl_3-MeOH-$

H_2O , 32 : 8 : 1, R_f 0.35; 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 8.038 (2 Н, 1 т, $CONH_2$), 7.185, 7.052, 6.998 (1 Н, 3 т, $3 \times NH$), 3.729, 3.620, 3.577 (2 Н, 3 д, ^{NH}J 5.7 Гц, $3 \times CH_2$ Gly), 1.385 (9 Н, с, $C(CH_3)_3$); MALDI-MS: 312 ($M + Na$)⁺, 328 ($M + K$)⁺.

Вос-(Gly)₄-NH₂ получен по описанной выше методике из $TFA \times H-(Gly)_3-NH_2$ и Вос-Gly-ONSu. Выход 76%; т. пл. >230°C (с разл.), ТСХ: $CHCl_3-MeOH-H_2O$, 32 : 8 : 1, R_f 0.23; 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 8.156, 7.191, 7.043, 6.998 (1 Н, 4 т, $4 \times NH$), 8.050 (2 Н, 1 т, $CONH_2$), 3.749, 3.726, 3.621, 3.585 (2 Н, 4 д, ^{NH}J 5.7 Гц, $4 \times CH_2$ Gly), 1.385 (9 Н, с, $C(CH_3)_3$); MALDI-MS: 369 ($M + Na$)⁺, 385 ($M + K$)⁺.

Вос-(Gly)₅-NH₂ получен по описанной выше методике из $TFA \times H-(Gly)_4-NH_2$ и Вос-Gly-ONSu. Выход 73%; т. пл. >250°C (с разл.); ТСХ: $CHCl_3-MeOH-H_2O$, 24 : 8 : 1, R_f 0.20; 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 8.156, 8.144, 7.191, 7.043, 6.998 (1 Н, 5 т, $5 \times NH$), 8.050 (2 Н, 1 т, $CONH_2$), 3.755–3.615 (м, $4 \times CH_2$ Gly), 3.585 (2 Н, д, ^{NH}J 5.7 Гц, CH_2 Gly⁵), 1.385 (9 Н, с, $C(CH_3)_3$); MALDI-MS: 426 ($M + Na$)⁺, 442 ($M + K$)⁺. Найдено, %: С 44.73, Н 6.55, N 20.80. $C_{15}H_{26}N_6O_7$. Вычислено, %: С 44.77, Н 6.51, N 20.88.

Вос-(Gly)₆-NH₂ получен по описанной выше методике из $TFA \times H-(Gly)_5-NH_2$ и Вос-Gly-ONSu. В процессе реакции продукт выделялся в виде плохо растворимого осадка. Реакционная смесь была лиофилизована, остаток отмывали $MeOH$, отфильтровывали и высушивали в вакууме. Выход 50%; т. пл. >250°C (с разл.); ТСХ: $CHCl_3-MeOH-H_2O$, 24 : 8 : 1, R_f 0.17; 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 7.060 (~7 Н, уш. м, $7 \times NH$), 3.610 (~12 Н, уш. м, $6 \times CH_2$ Gly). Найдено, %: С 44.42, Н 6.39, N 21.29. $C_{17}H_{29}N_7O_8$. Вычислено, %: С 44.44, Н 6.36, N 21.34.

Вос-(Gly)₇-NH₂ получен аналогично Вос-(Gly)₆-NH₂. Выход 37%; т. пл. >250°C (с разл.). Найдено, %: С 44.09, Н 6.34, N 21.52. $C_{19}H_{32}N_8O_9$. Вычислено, %: С 44.18, Н 6.24, N 21.69.

Вос-(Gly)₈-NH₂ получен аналогично Вос-(Gly)₆-NH₂. Выход 35%; т. пл. >250°C (с разл.). Найдено, %: С 43.93, Н 6.22, N 21.87. $C_{21}H_{35}N_9O_{10}$. Вычислено, %: С 43.98, Н 6.15, N 21.98.

Синтез трифторацетатов олигоглицинамидов ($TFA \times H-(Gly)_m-NH_2$). Общий метод. К 1 г Вос-(Gly)_m-NH₂ прибавили 5 мл CF_3COOH , реакционную смесь выдержали 2 ч при комнатной температуре и соупарили с 20 мл толуола. Остаток перемешивали 2 ч с 10 мл Et_2O , отфильтровали и высушили в вакууме. Выход 90–95%.

$TFA \times H-(Gly)_3-NH_2$: т. пл. 230°C (с разл.); ТСХ: $EtOAc-Py-AcOH-H_2O$, 3 : 1 : 1 : 1, R_f 0.55; 1H -ЯМР (D_2O): 4.080, 4.056, 3.930 (2 Н, 3 с, $3 \times CH_2$ Gly); MALDI-MS: 188 (M)⁺, 211 ($M + Na$)⁺, 227 ($M + K$)⁺.

$TFA \times H-(Gly)_4-NH_2$: т. пл. >250°C (с разл.); ТСХ: $EtOAc-Py-AcOH-H_2O$, 3 : 1 : 1 : 1, R_f 0.46; 1H -ЯМР (D_2O): 4.080, 4.026, 3.957, 3.928 (2 Н, 4 с, $4 \times CH_2$ Gly); MALDI-MS: 245 (M)⁺, 268 ($M + Na$)⁺, 284 ($M + K$)⁺.

TFA × H-(Gly)₅-NH₂: т. пл. >300°C (с разл.); ТСХ: EtOAc–Py–AcOH–H₂O, 3 : 1 : 1 : 1, R_f 0,20; ¹H-ЯМР (D₂O): 4.075, 4.065, 4.057, 3.995, 3.840 (2 H, 5 с, 5 × CH₂ Gly); MALDI-MS: 302 (M)⁺, 325 (M + Na)⁺, 341 (M + K)⁺.

TFA × H-(Gly)₆-NH₂: т. пл. >300°C (с разл.); ТСХ: EtOAc–Py–AcOH–H₂O, 3 : 1 : 1 : 1, R_f 0; ¹H-ЯМР (D₂O): 4.087, 4.038, 4.030, 4.015, 3.953, 3.928 (2 H, 6 с, 6 × CH₂ Gly); MALDI-MS: 359 (M)⁺, 382 (M + Na)⁺, 398 (M + K)⁺.

TFA × H-(Gly)₇-NH₂: т. пл. >300°C (с разл.); ¹H-ЯМР (D₂O): 4.075 (уш. с, CH₂ Gly); MALDI-MS: 416 (M)⁺, 439 (M + Na)⁺, 455 (M + K)⁺.

TFA × H-(Gly)₈-NH₂: т. пл. > 300°C (с разл.); ¹H-ЯМР (D₂O): 4.070 (уш. CH₂ Gly); MALDI-MS: 473 (M)⁺, 496 (M + Na)⁺, 512 (M + K)⁺.

Для олигоглицинамидов с *m* = 5–8 проводилась дополнительная очистка: 10 ммоль TFA × H-(Gly)_{*m*}-NH₂ растворяли в 20 мл H₂O, к полученному раствору прибавляли 20 мл 1 М NaHCO₃, через 1 ч отфильтровывали выпавший осадок H-(Gly)_{*m*}-NH₂. Продукт высушивали в вакууме. Выход 70–75%.

Синтез полимерных конъюгатов олигоглицинов (PHEAA-(Gly)_{*m*}-OH и PHEAA-(Gly)_{*m*}-NH₂). Общий метод. К раствору PNPA в DMSO (10 мг/мл) прибавляли рассчитанные количества пептидов HCl × H-(Gly)_{*m*}-OH (0.05, 0.1 или 0.2 моль/моль PNPA) или TFA × H-(Gly)_{*m*}-NH₂ (0.2 или 0.5 моль/моль PNPA) и NEt₃ (1 моль/моль пептида). Реакционную смесь выдерживали при 40°C, осуществляя контроль за ходом реакции с помощью ТСХ. После исчезновения свободного пептида из реакционной смеси прибавляли 300 мкл EA и инкубировали при 50°C в течение 24 ч. Выделение продукта проводили методом эксклюзионной гель-хроматографии LH-20, элюция – MeCN–H₂O, 1 : 1. Выход конъюгатов 75–90%.

PHEAA-(Gly)₃-NH₂ (20). ¹³C-ЯМР (D₂O): 183.0 (CONH₂), 177.0, 176.5 (CONH, PHEAA), 172.0, 171.1 (CONH, Gly), 59.9 (CHON, PHEAA), 45.4 (CH, PHEAA), 43.3, 42.5, 41.5 (HNCH₂CO, Gly), 41.3 (NCH₂, EA), 35.8 (CH₂, PHEAA); аминокислотный анализ: 0.39 мкмоль Gly/мг образца (93% от теор.).

PHEAA-(Gly)₃-NH₂ (50). Аминокислотный анализ: 0.52 мкмоль Gly/мг образца (61% от теор.).

Динамическое светорассеяние водных растворов олигоглицинов, олигоглицинамидов и их полимерных конъюгатов, PHEAA-(Gly)_{*m*}-OH и PHEAA-(Gly)_{*m*}-NH₂ изучали с помощью автоматического анализатора размеров субмикронных частиц Coulter N4MD (Beckman Instruments Inc., США) (He-Ne-лазер, λ 632.8 нм, угол измерения 62.5°, интервал измерения 3–3000 нм). Измерения проводили для растворов с концентрацией 4 мг/мл; для приготовления растворов использовали дистиллированную воду Milli-Q. Эксперименты проводили непосредственно после приготовления

водных растворов, а также после инкубации растворов в течение 24 ч при комнатной температуре. Для изучения влияния среды на поведение пептидов в растворах к ним прибавляли LiCl, NaHCO₃ либо HCl (конц.). Концентрации растворов и данные об их светорассеянии представлены в табл. 1 и 2.

Аналитическую гель-хроматографию полученных соединений проводили, используя хроматограф LKB 2140, колонку TSK G 4000SW, 7.5 × 300 мм (LKB-Produkt AB, Bromma, Швеция), элюент – 0.2 М NaCl, скорость потока – 1 мл/мин, УФ-детекция при 210 нм. Времена выхода конъюгатов PHEAA-(Gly)_{*m*}-OH, PHEAA-(Gly)_{*m*}-NH₂, а также PHEAA находились в диапазоне 9.3–9.6 мин.

Атомно-силовая микроскопия. К раствору TFA × H-(Gly)_{*m*}-NH₂ в воде (1 мг/мл) прибавляли NaHCO₃ (2 экв. в расчете на аминогруппу пептида) и 10 мкл раствора наносили на подложку из слюды (“PLANO W/Plannet GmbH”, Германия), через 10 мин потоком аргона удаляли раствор с подложки и высушивали полученный препарат в токе азота. Изучение препаратов проводили на атомно-силовом микроскопе NanoScope II (Digital Instruments, Santa Barbara, США); частота сканирования составляла 3–7 Гц; угол сканирования составлял 180° или 270°.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 04-03-32683, а также гранта “Молекулярная и клеточная биология” Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bamford C., Brown L., Cant E., Elliot A., Hanby W., Malcom B. // Nature. 1955. V. 176. P. 396.
2. Crick F., Rich A. // Nature. 1955. V. 176. P. 78–781.
3. Bella J., Puiggali J., Subirana J. // Polymer. 1994. V. 35. P. 1291–1297.
4. Franco L., Subirana J., Puiggali J. // Polymer. 1998. V. 39. P. 5553–5560.
5. Avignon M., Garrigou-Lavrange C. // Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy. 1971. V. 27. P. 297–309.
6. Okabayashi H., Ohshima K., Etori H., Debnath R., Taga K., Yoshida T., Nishio E. // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1990. V. 86. P. 1561–1567.
7. Etori H., Taga K., Watanabe K., Okabayashi H., Ohshima K. // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1997. V. 93. P. 313–319.
8. Shimizu T., Kogiso M., Masuda M. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 6209–6210.
9. Tuzikov A., Chinarev A., Gambaryan A., Oleinikov V., Klinov D., Matsko N., Kadykov V., Ermishov M., Demin I., Demin V., Rye P., Bovin N. // ChemBioChem. 2003. V. 4. P. 147–154.
10. Simrad M., Su D., Wuest J. // J. Am. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 4696–4698.

11. Tsygankova S., Zaitsev I., Chinarev A., Tuzikov A., Severin N., Kalachev A., Rabe J., Bovin N. // *NanoLett.* 2005. in press.
12. Keller B., Sauer N., Lamb C.J. // *EMBO J.* 1988. V. 7. P. 3625–3633.
13. Keller B., Templeton M.D., Lamb C.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 1529–1533.
14. Coulter Scientific Instruments. ATTN: Technical communications. Florida: BUSINESS REPLY MAIL, Hialeah, 1986.
15. Bovin N. // *Glycoconjugate J.* 1998. V. 15. P. 431–436.
16. Arshady R. // *Adv. Polym. Sci.* 1994. V. 111. P. 1–41.
17. Гершкович А.А., Кибирев В.Ч. Химический синтез пептидов. Киев: Наукова думка, 1992.
18. Bovin N., Korchagina E., Zemlyanukhina T., Byramova N., Galanina O., Zemlyakov A., Ivanov A., Zubov V., Mochalova L. // *Glycoconjugate J.* 1993. V. 10. P. 142–151.
19. Tugit A., Scheffler J.-J. // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 124. P. 585–588.
20. Fischer E. // *Ber.* 1904. V. 37. P. 2500–2507.

Spontaneous and Promoted Association of Linear Oligoglycines

I. V. Gorokhova, A. A. Chinarev, A. B. Tuzikov, S. V. Tsygankova, and N. V. Bovin[#]

[#] Phone: +7(495) 330-71-38; e-mail: bovin@carb.ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

Linear oligoglycines of various lengths bearing a carboxyl or an amide group at their C-termini and also their poly(acrylamide) conjugates were synthesized. No self-assembly into supramolecular structures was observed for free oligoglycines H-(Gly)_m-OH (*m* = 3–5). At the same time, oligoglycylamides H-(Gly)_m-NH₂ (*m* = 3–5) demonstrated ability for both self-assembly in aqueous solution and assembly promoted by an additional interaction with surface. In the case of polymer-bound oligoglycines (and their amides), no intramolecular clustering of peptide chains, as expected, was observed. This means that the presence of several oligoglycine chains bound to each other in one center is not a necessary prerequisite for polyglycine II-type association. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2006, vol. 32, no. 5; see also <http://www.maik.ru>

Key words: peptides, poly(acryl amide) conjugates, polyglycine II, self-assembly