

УДК 547.964.4

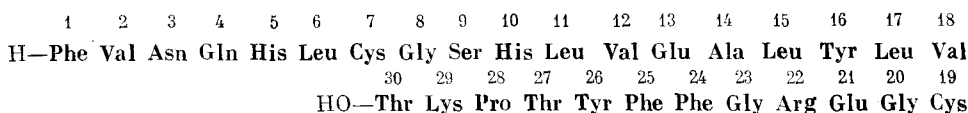
БИОХИМИЯ

М. И. ТИТОВ, З. А. АДРЕМАСОВА, Ж. Д. БЕСПАЛОВА, Л. И. ЛЕОНТЬЕВА

СИНТЕЗ В-ЦЕПИ ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 2 VIII 1972)

В-цепь инсулина человека, в отличие от инсулинов других видов, в положении 30 вместо остатка аланина содержит остаток треонина:

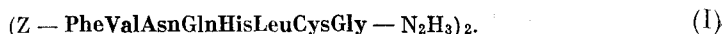


В 1966 г. группа Катсоянниса сообщила о первом синтезе В-цепи инсулина человека ⁽¹⁾, комбинация которой с цепью А привела к препарату с инсулиноподобной активностью. Однако оказалось, что при удалении защитных групп обработкой натрием в жидком аммиаке происходило полное разрушение С-терминального треонинового остатка ^(2, 3). Позднее Катсояннис показал, что использование 50-кратного избытка амида натрия при такой обработке позволяет избежать этой побочной реакции ⁽⁴⁾. К сожалению, в работе отсутствуют какие-либо данные о комбинации полученной В-цепи с цепью А, так что пока невозможно сделать окончательные выводы о практической ценности предложенного метода.

Решающим недостатком синтеза является использование бензильных защит на меркаптогруппах цистеина, отщепление которых требует обязательной обработки натрием в жидком аммиаке, приводящей к целому ряду побочных реакций. Совершенно очевидно, что успешный синтез В-цепи инсулина человека может быть осуществлен только при отказе от использования S-бензильных защит ⁽³⁾. Такая возможность была убедительно продемонстрирована Цаном и Шмидтом на примере синтеза на основе симметричных цистиновых производных В-цепи инсулина быка ⁽²⁾.

Воспользовавшись этим положительным опытом при работе с цистиновыми пептидами, мы синтезировали на их основе В-цепь инсулина человека.

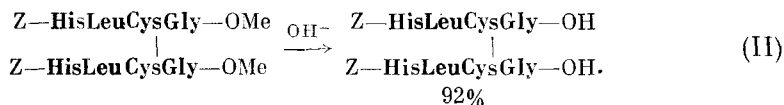
Поскольку В-цепь содержит два цистеиновых остатка в положениях 7 и 19 и поскольку конденсация двух димерных цистиновых пептидов приводит к полимеру, последняя конденсация в полном синтезе В-цепи должна быть конденсацией двух больших димерных пептидов с местом разрыва где-то между седьмым и девятнадцатым положениями. В качестве такого места разрыва мы выбрали пептидную связь между аланином-14 и лейцином-15. В свою очередь, фрагмент 1—14 было решено синтезировать конденсацией фрагментов 1—8 и 9—14, а фрагмент 15—30 соответственно из фрагментов 15—20 и 21—30. Димерный октапептид последовательности 1—8 был синтезирован нами первоначально в виде его бис-метилового эфира ⁽⁵⁾, который обработкой гидразином был переведен в соответствующий гидразид



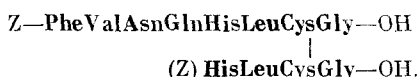
Для определения оптимальных условий азидной конденсации фрагментов 1—8 и 9—14 были поставлены модельные опыты. При этом в различных условиях конденсировали октапептид 1—8 (I) с производными серина (H—Ser—OMe и H—Ser—(tBu)—OMe), получаемый продукт выделяли и определяли его аминокислотный состав. Во всех исследованных случаях

продукт реакции не содержал серина. Более того, азидная конденсация $(Z\text{—GysGly—N}_2\text{H}_3)_2$ с H—Ser(tBu)—OMe приводила к смеси продуктов, хроматографическое исследование которой показало полное отсутствие ожидаемого трипептида $(Z\text{—GysGlySer(tBu)—OMe})_2$, который был гладко приготовлен карбодимидным методом.

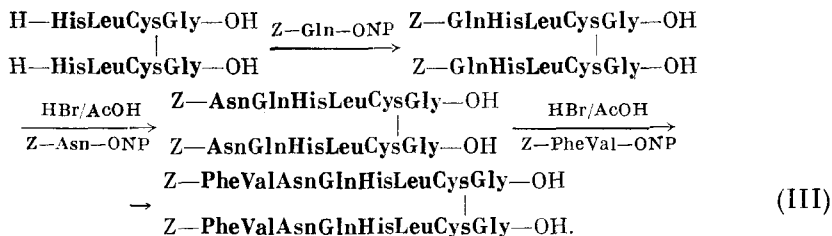
Для проведения карбодимидной конденсации фрагментов 1–8 и 9–14 необходимо было приготовить октапептид 1–8 со свободной С-терминальной карбоксильной группой. Все попытки приготовить этот пептид омылением соответствующего метилового эфира к успеху не привели. Такое омыление удалось удовлетворительно провести только на стадии тетрапептида 5–8:



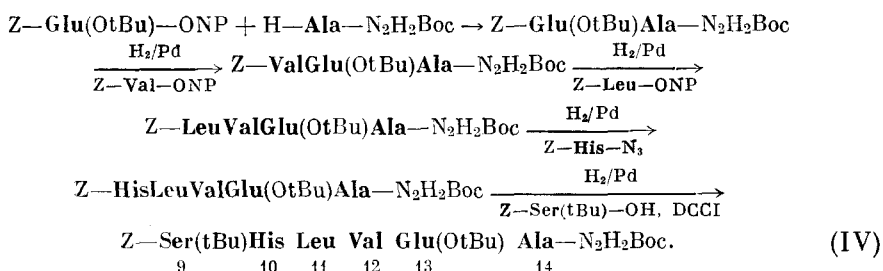
При дальнейшем наращивании пептидной цепи, исходя из полученного пептида II и *n*-нитрофениловых эфиров карбобензокси-аминокислот, мы получили первоначально продукт неполного ацилирования:



Лишь после изменения условий проведения конденсаций нам удалось получить симметричный пептид:

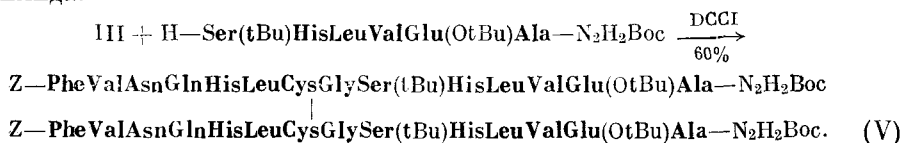


Гексапептид последовательности 9–14 был приготовлен последовательным наращиванием пептидной цепи по одной аминокислоте, начиная с защищенного гидразида аланина:

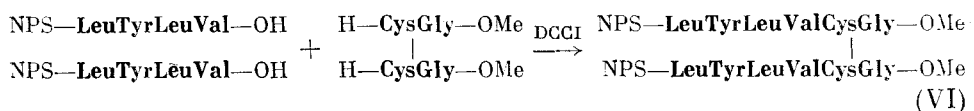


Остаток гистидина присоединяли также и с помощью 2,4,5-трихлорфенилового эфира дикарбобензокси-гистидина (т. пл. 114–117°), который, в отличие от соответствующего *n*-нитрофенилового эфира, оказался устойчивым и не изменял констант при хранении на открытом воздухе в течение нескольких месяцев.

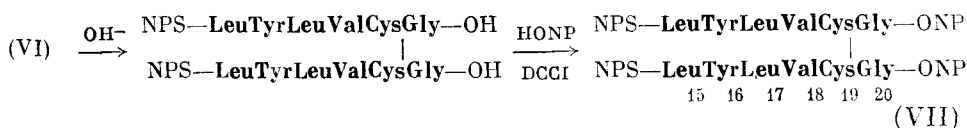
Гексапептид IV был подвергнут каталитическому гидрогенолизу, после чего был соединен с фрагментом 1–8 (III) с помощью дициклогексилкарбодимиды:



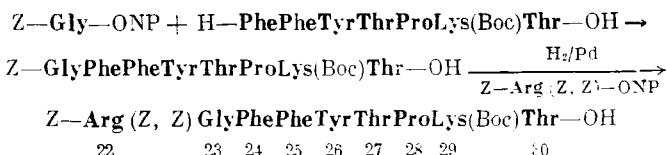
Метилловый эфир димерного гексапептида последовательности 15—20 (VI), полученный нами ранее ⁽⁷⁾ постепенным наращиванием пептидной цепи по одной аминокислоте, был приготовлен также более удобной, с прециптитивной точки зрения, конденсацией фрагментов 15—18 и 19—20 с помощью дициклогексилкарбодиимида:



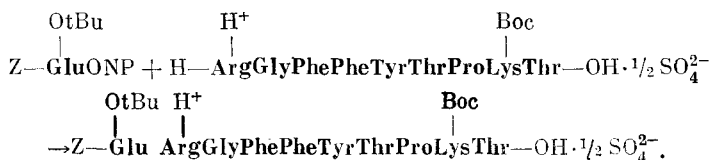
После омыления продукта VI и последующей карбодиимидной конденсации с *n*-нитрофенолом был получен соответствующий *n*-нитрофениловый эфир:



Нонапептид последовательности 22—30, полученный из описанного нами ⁽⁸⁾ гептапептида 24—30,



подвергался каталитическому гидрогенолизу в присутствии одного эквивалента 1 *N* серной кислоты, необходимого для протонирования гуанидиновой группы аргининового остатка, после чего проводилась конденсация с *n*-нитрофениловым эфиром карбобензоксиг-трет-бутил-глутамата:

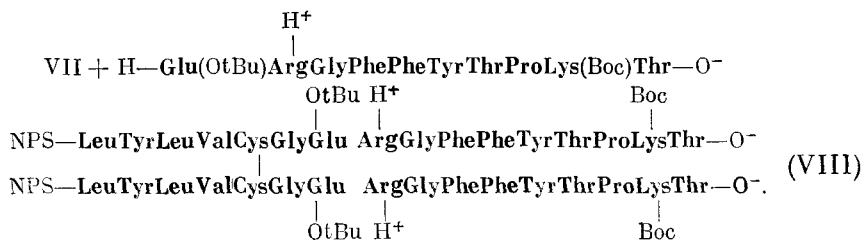


Однако оказалось, что конденсация в данном случае протекает относительно медленно, причем при любом избытке ацилирующего реагента в реакционной смеси остается достаточно большое количество непрореагировавшего нонапептида. Это существенно затрудняло очистку получаемого декапептида, так как его растворимость в водных и безводных растворителях не отличалась от растворимости исходного нонапептида. Добавление одного или двух эквивалентов щелочи к реакционной смеси не вносило никаких изменений в ход синтеза. Впоследствии отгидрированный в присутствии одного эквивалента серной кислоты нонапептид стали обрабатывать ионообменной смолой Амберлит ИРА-410 в OH⁻-форме. При этом получался нонапептид, свободный от ионов SO₄²⁻, в котором гуанидиновая группа аргинина блокирована протоном карбоксильной группы C-терминального тренина:

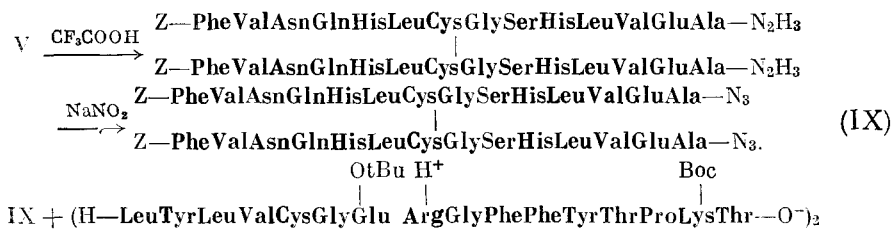


Конденсация такого нонапептида с γ-трет-бутиловым эфиром карбобензоксиглутаминовой кислоты уже при небольшом избытке ацилирующего агента приводит к полному использованию аминокомпоненты, и, таким образом, очистка получаемого декапептида не вызывает уже никаких затруднений.

Полученный таким образом декапептид после каталитического гидрогенолиза в присутствии эквивалента серной кислоты и последующей обработки ионообменной смолой конденсировали с *n*-нитрофениловым эфиром гексапептида последовательности 15–20 (VII):



Удаление *o*-нитрофенилсульфонильной защиты с полученного гексадекапептида 15–30 (VIII) проводили обработкой эквивалентным количеством хлористого водорода в метаноле в присутствии 10 эквивалентов уксусной кислоты. Избыток кислоты удаляли обработкой анионитом, полученный продукт конденсировали с азидом, полученным из 45 мг продукта V:



↓
полимер защищенной В-цепи.

Полимер защищенной В-цепи обрабатывали бромистым водородом в трифторуксусной кислоте, подвергали окислительному сульфитолизу и диализу. После лиофилизации полученного раствора была проведена комбинация с цепью А⁽⁹⁾, выделенной из фабричного инсулина (смесь бычьего и свиного инсулинов). Общее содержание полученной инсулиновой активности, определенное по понижению содержания сахара в крови кроликов, составило 15 м. ед., что соответствует 0,6 мг инсулина. Таким образом, выход инсулиновой активности, рассчитанный на защищенный гидразид тетрадекапептида V, составил 0,6%.

Ленинградский государственный университет
им. А. А. Ждапова

Поступило
28 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. G. Katsoyannis, A. M. Tometsko et al., J. Am. Chem. Soc., 88, 164 (1966).
- ² A. Marglin, R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 88, 5051 (1966).
- ³ H. Zahn, T. Okuda, Y. Shimonishi, Peptides, Proc. VIII Europ. Peptide Symposium, Noordwijk, 1966, Amsterdam, 1967, p. 108.
- ⁴ P. G. Katsoyannis, J. Ginos et al., J. Am. Chem. Soc., 93 (22), 5877 (1971).
- ⁵ H. Zahn, G. Schmidt, Tetrahedron Letters, 50, 5095 (1967); Lieb. Ann. Chem., 731, 91, 101 (1970).
- ⁶ М. И. Титов, З. А. Ардемасова, ЖОХ, 41, 1403 (1971).
- ⁷ М. И. Титов, Ж. Д. Беспалова, Л. И. Леонтьева, ЖОХ, 41, 928 (1971).
- ⁸ М. И. Титов, Ж. Д. Беспалова, Л. И. Леонтьева, ЖОХ, 41, 224 (1971).
- ⁹ Du Yu-cang, Jiang Rong-qing, Tsou Chen-Iu, Scientia Sinica, 14, 229 (1965).