



УДК 577.112.6.083.3

СИНТЕЗ И ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДОВ УЧАСТКА
200—210 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОНКОБЕЛКА p28^{sis}Антоненко В. В., Прудченко И. А., Михалева И. И.,
Мазуренко Н. Н.*, Киселев Ф. Л.*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва;* Научно-исследовательский институт канцерогенеза
Всесоюзного онкологического научного центра АМН
СССР, Москва

Описан синтез пептидов последовательности 201—210 и 200—206 онкобелка p28^{sis}. Этот участок онкобелка был выбран в качестве возможного эпитопа на основании расчета вторичной структуры и профиля гидрофильности. Синтез осуществлен классическим методом в растворе с использованием боковых защитных групп бензильного типа. Получены конъюгаты пептидов с белками-носителями и поликлональные антитела к ним. Показано, что антисыворотка против конъюгата пептида последовательности 201—210 специфична по отношению к онкобелку p28^{sis} и его димеру p56^{sis}.

В последние годы важным инструментом исследования функционально важных и малодоступных белков становятся поликлональные и моноклональные антитела, получаемые при использовании в качестве антигенов как самих белков, так и их пептидных фрагментов. Антитела к продуктам онкогенов, присутствующим в клетках в очень малом количестве, представляют уникальные возможности для изучения проблем их структурно-функциональной организации, локализации, взаимодействия с клеточными мишенями, т. е. ключевых вопросов для понимания их роли в процессах роста и дифференциации клеток и механизмов канцерогенеза.

Среди известных онкобелков большое внимание вызывает p28^{sis}, продукт экспрессии онкогена *sis*, обнаруженного в геноме трансформирующего вируса SSV [1, 2]. Этот онкобелок оказался близкородственным тромбоцитарному фактору роста человека (PDGF, platelet-derived growth factor) [3, 4], т. е. митогену для клеток соединительной ткани человека: 109 N-концевых остатков В-цепи PDGF практически идентичны участку последовательности белка p28^{sis}.

Причина столь высокой гомологии состоит в том, что клеточный протоонкоген (*c-sis*), соответствующий содержащемуся в геноме SSV гену *v-sis*, кодирует одну из аминокислотных цепей PDGF [5, 6]. К настоящему времени исследованы структуры более 20 различных ретровирусных онкогенов, идентифицированы их белковые продукты и проведен структурный анализ их клеточных гомологов. Клеточный протоонкоген *c-sis* — первый из протоонкогенов, нормальная клеточная функция которого уже в достаточной мере известна и, по всей вероятности, состоит в кодировании митогенного фактора.

В качестве первого этапа начатых нами исследований роли некоторых клеточных протоонкогенов и продуктов их экспрессии в механизмах воз-

В работе приняты стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC—IUB; кроме того, использованы следующие сокращения: Adc — адамантилоксикарбонил, Aoc — трет-амилоксикарбонил, Bom — бензилоксиметил, BSA — бычий сывороточный альбумин, Cl-Z — 2-хлорбензилоксикарбонил, DCC — N,N'-дихлороэксилкарбодимид, DMF — диметилформамид, ELISA — твердофазный иммуноферментный анализ, HOBT — 1-гидроксибензотриазол, KLN — гемоцианин улитки, NEM — N-этилморфолин, NMM — N-метилморфолин, OPfp — 2,3,4,5,6-пентафторфенилокси-, SSV — вирус саркомы шерстистых обезьян, TFA — трифторуксусная кислота, THF — тетрагидрофуран.

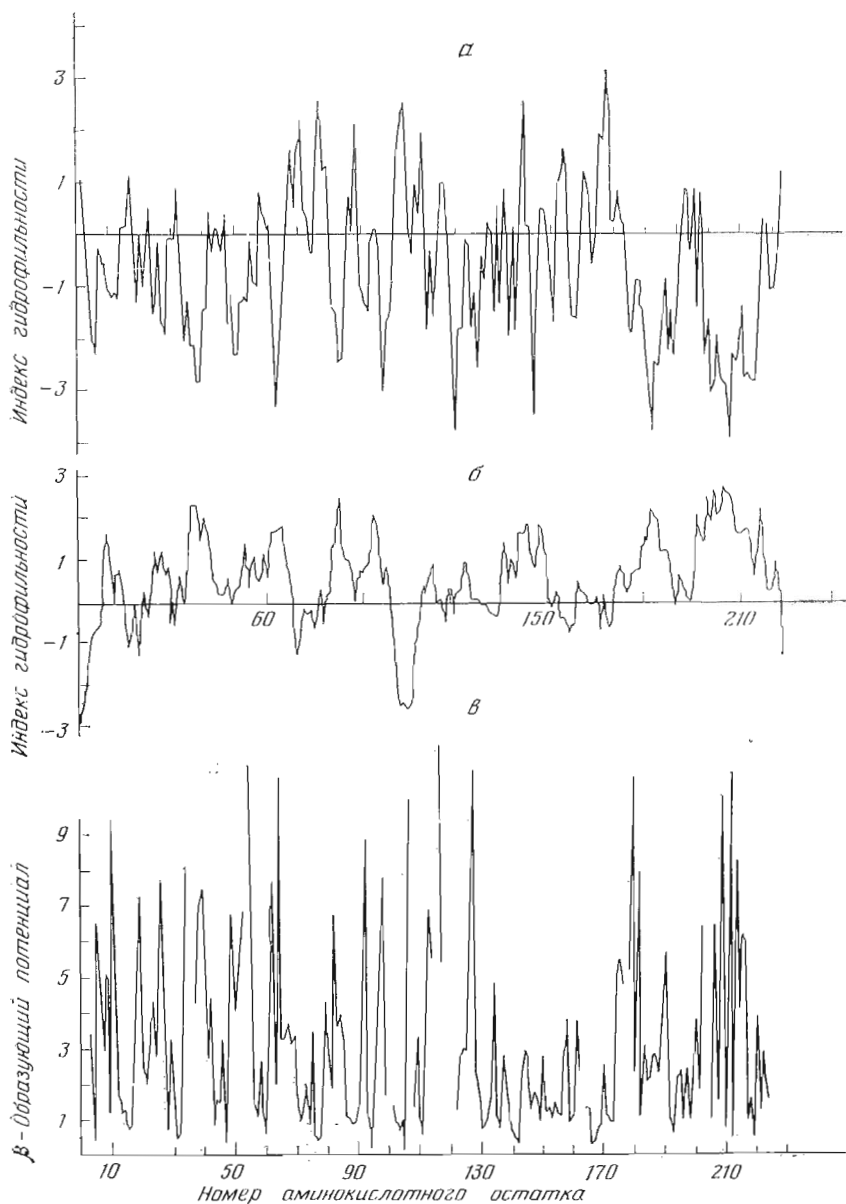
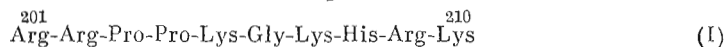


Рис. 1. Профиль гидрофильности белка $p28^{sis}$, рассчитанный по методу Кайта — Дулиттла (а) и по методу Хоппа — Вудса (б); в — распределение вероятных участков с β -изгибами для белка $p28^{sis}$, рассчитанное по методу Чоу — Фасмана

никновения злокачественных опухолей у человека мы поставили задачу получения антител, специфичных к белковым продуктам онкогенов *sis* и *fos*. В настоящей работе описано получение антител, специфичных к онкобелку $p28^{sis}$. С этой целью нами были синтезированы пептиды (I) и (II) участка последовательности 200—210 белка $p28^{sis}$:



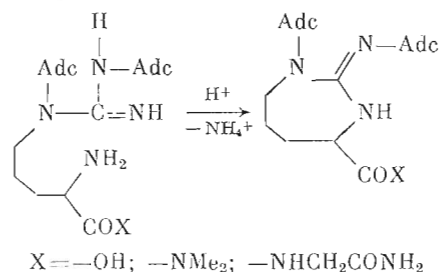
Этот участок был выбран нами в соответствии с эмпирическими правилами нахождения эпитопов, основанными на анализе особенностей вторичной структуры белка и профиля его гидрофильности.

Профиль гидрофильности белка был рассчитан по методу, предложенному Кайтом и Дулиттлом [7] (длина сегмента скаширования — 4 аминокислоты).

кислотных остатка; расчет по средним индексам гидропатии) и по методу Хоппа — Вудса [8] (длина сегмента скапирования — 6 аминокислотных остатков). Оба метода дали приблизительно одинаковое распределение гидрофильных и гидрофобных участков по аминокислотной цепи белка (рис. 1а, б). Согласно указанным методам, на рис. 1а гидрофильным участкам белка соответствуют отрицательные значения индекса гидрофильности, на рис. 1б — положительные.

Вторичную структуру белка оценивали по методу Чоу — Фасмана [9] (рис. 1в). Область 200—215, соответствующую гидрофильной зоне и участку локализации β-изгибов, мы сочли вероятной антигенной детерминантой белка.

Синтез пептидов (I) и (II) был осуществлен классическими методами пептидного синтеза в растворе. Структурной особенностью декапептида, предопределившей выбор защитных групп, было присутствие трех остатков аргинина и трех остатков лизина. Первоначально мы остановились на схеме синтеза с использованием кислотлабильных боковых защитных группировок, при этом для блокирования гуанидиновой группы аргинина была использована N^G-диадамантилоксикарбонильная защита. Однако в ходе синтеза мы столкнулись со значительной неустойчивостью как Z-Arg(Adc₂)-OH, так и полученных на его основе пептидов. Так, конденсация Z-Arg(Z₂)-Arg(Adc₂)-ONsu с тетрапептидом Pro-Pro-Lys(Boc)-Gly привела к большому числу неидентифицированных продуктов, среди которых не был найден искомый. Повышенная лабильность пептидов, содержащих Arg(Adc₂)-остаток в цепи, не ограничивается, по-видимому, только описанной ранее [10] побочной реакцией циклизации соединений типа H-Arg(Adc₂)-X в производные 1,3-диазациклогексана.



Обнаруженный факт не позволяет широко использовать N^G,N^G-диадамантилоксикарбонильные производные аргинина в синтезе. Видимо, именно этим обстоятельством, а не труднодоступностью этих производных можно объяснить практически полное отсутствие в литературе работ с их использованием.

Далее мы исследовали применимость для синтеза пептидов двух других N^G-защитных групп — дибензилоксикарбонильной и тозилной. Пептид (I) получен по схеме 1 путем фрагментной конденсации тетра- и гексапептида, при этом каждый из блоков был синтезирован последовательным удлинением цепи с C-конца с использованием следующего набора защитных групп: N^α — Boc, Aoc (для Arg); N^{1'm} — Bom; N^ε — Z, Cl-Z; N^G — Tos; α-COOH — OBzl. Из-за наличия в C-концевом гексапептиде трех остатков лизина и известной повышенной лабильности N^ε — Z-группы в условиях ацидолитического удаления N^α — Boc-группы нам пришлось применить более устойчивую к кислотам Cl — Z-группу для Lys²⁰⁵, так как ни один из способов ацидолиза защищенного гексапептида 205—216 (TFA — AcOH, 7 : 3; TFA — H₂O, 7 : 3, и BF₃·Et₂O — AcOH) не привел к однородному продукту, не загрязненному побочными пептидами с открытой ε-аминогруппой. В то же время в случае пептидов только с двумя остатками лизина в цепи удавалось получить N^α-деблокированные пептиды (IXa), (Xa) в достаточно чистом виде. Для образования амидных связей использовали метод смешанных ангидридов, метод активированных эфиров (OPfr или ONp) или DCC/NOBt. При соединении блоков лучшие результаты были получены при использовании мето-*n*-толуол-

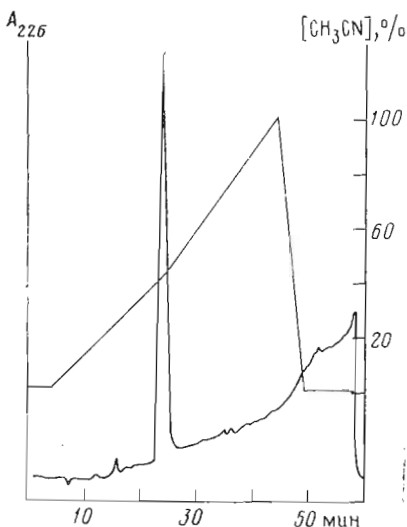


Рис. 2

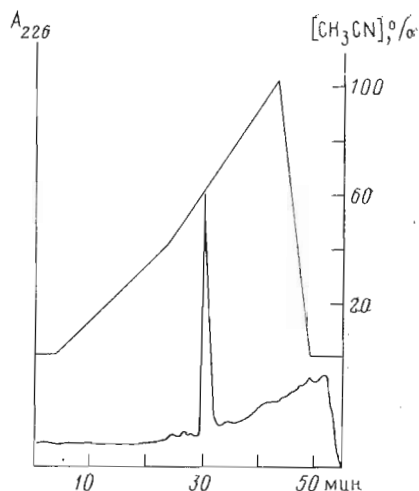


Рис. 3

Рис. 2. Аналитический профиль ВЭЖХ пептида (I) на колонке (4,6×250 мм) Ultra-sphere ODS в 0,1% TFA в градиенте концентрации CH_3CN . Скорость элюции 2,0 мл/мин, нагрузка 0,6 мг

Рис. 3. Аналитический профиль ВЭЖХ пептида (II) в условиях анализа пептида (I) (рис. 2). Нагрузка 0,3 мг

матографии на колонке с сефадексом LH-20 в метаноле привели к разложению пептида с образованием большого числа продуктов с близкими молекулярными массами. При использовании же в качестве элюента DMF — AcOH пептид (XVIII) был получен в гомогенном состоянии с хорошим выходом. Удаление азитных групп провели с помощью HBr/TFA.

Таким образом, N^G -диацилированные производные аргинина на основе Z- или Adc-групп не являются, согласно нашим результатам, подходящими производными для синтеза Arg-содержащих пептидов. Применение N^G -тозилных производных позволило получить декапептид (XII) без осложнений. Свободные пептиды (I) и (II) окончательно очищены методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Ultra-sphere ODS в 0,1% TFA в градиенте концентрации ацетонитрила (0 → 40%). Индивидуальность продуктов доказана аминокислотным анализом, ТСХ в нескольких системах, аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 2, 3) и ^1H -ЯМР-спектроскопией.

Полученные пептиды конъюгировали с BSA (Sigma, США) и KLH (Calbiochem, США), активируя их C-конец с помощью водорастворимого карбодимида. Иммунизацию кроликов проводили конъюгатом пептида (I) с KLH в смеси с полным адьювантом Фройнда. Через 4 нед иммунизацию повторяли, через 6 нед брали кровь и определяли титр антител в анти-сыворотке методом ELISA*. Для этого конъюгат пептида (I) с BSA сорбировали на пластиковые платы и комплекс антиген — антитело детектировали с помощью конъюгированных с пероксидазой козьих антител против иммуноглобулина G кролика. Титр антител против декапептида (I) в полученной сыворотке составил $5 \cdot 10^3$ (титром считали такое разведение сыворотки, при котором достигалась $1/2$ максимального поглощения при 405 нм при проведении ELISA).

Специфичность антител к продукту экспрессии онкогена *sis* в клетках, продуцирующих вирус SSV (клетки мармозеток HF-4-SSV и клетки почки крысы NRK-49, инфицированные SSV, — NRK-SSV), оценивали методом радиоиммунопреципитации и иммуноблоттинга. Полученная анти-сыворотка выявила белок $p28^{sis}$ в клетках NRK-SSV в присутствии мер-

* Подробное описание использованных в этой работе условий проведения ELISA, иммунопреципитации и иммуноблоттинга будет приведено в статье этих же авторов в журнале «Молекулярная биология» в 1987 г.

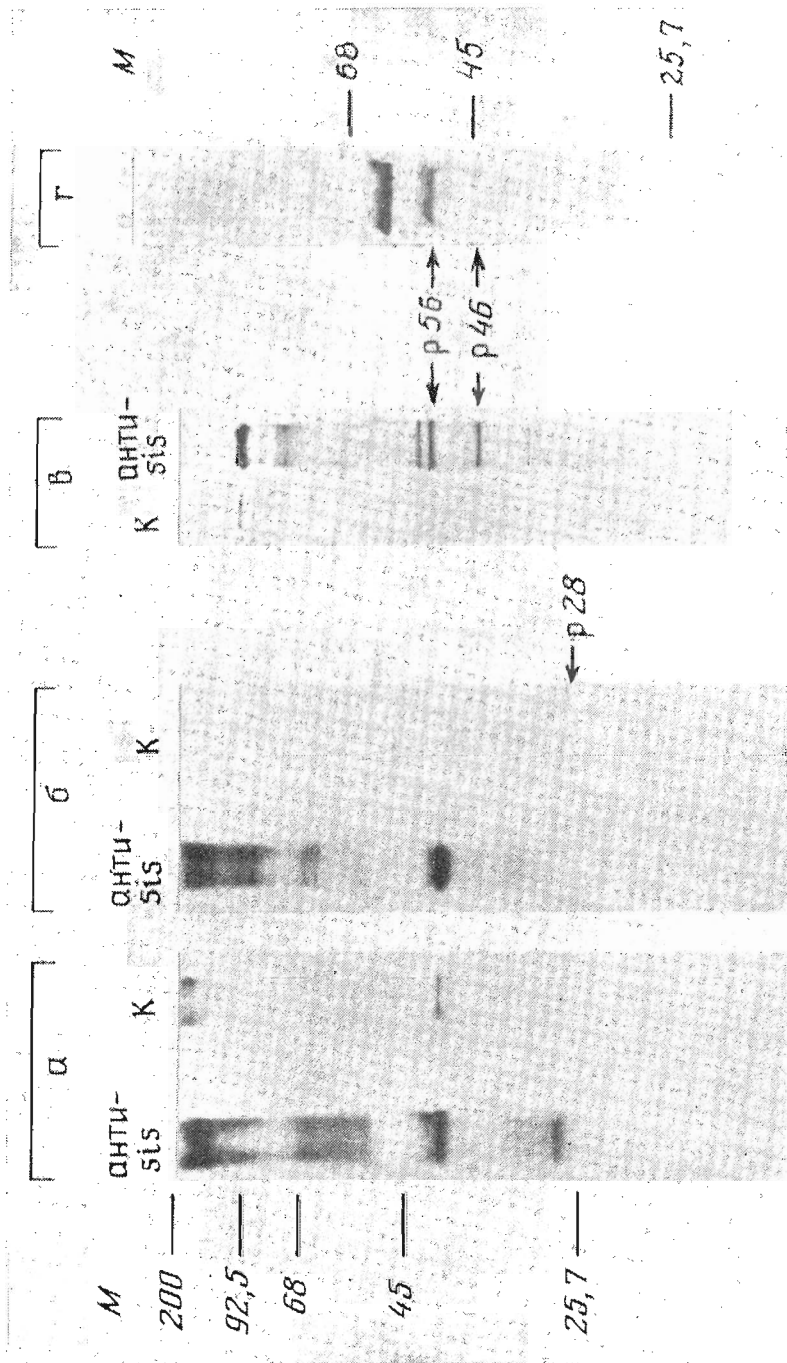


Рис. 4. Выявление белка р28^{sis} в клетках, трансформированных вирусом SSV. Преципитация антисывороткой против конъюгата декаплетта (I) с КЛН (анти-*sis*) и неймунной сывороткой (K, контроль) лизатов клеток NRK-SSV (a), NRK-49 (б) и HF-4-SSV (в). 2 - иммунооблоттинг клеточек NRK-SSV с антисывороткой анти-*sis*. Условия проведения преципитации и иммунооблоттинга см. в «Экспер. части». Опыты «а» и «б» выполнены в присутствии меркаптоэтанола, «в» и «г» - в отсутствие восстанавливающего агента. M - молекулярная масса в килодальтонах

каптоэтанол (рис. 4а) и не обнаружила его в неинфицированных клетках NRK-49 (рис. 4б). Контрольная (неиммунная) сыворотка не определила наличия *sis*-родственных белков. В отсутствие меркаптоэтанолла полученная антисыворотка выявляет белок с молекулярной массой 56 кДа в клетках HF-4-SSV (рис. 4в) и NRK-SSV (рис. 4г), который, видимо, представляет собой димер белка $p28^{sis}$ — естественный продукт [11] в цепи посттрансляционных превращений белка $p28^{sis}$. Поливалентные антитела обнаружили также другие белки, по-видимому, имеющие гомологичные участки последовательности, в частности белок p46. Сыворотки к конъюгатам гептапептида (II) пока не исследованы.

Таким образом, антипептидные антитела, полученные на основе выбранного и синтезированного нами участка последовательности онкобелка $p28^{sis}$, обладают способностью специфически узнавать сам белок и его димер $p56^{sis}$ в лизатах клеток, зараженных трансформирующим вирусом SSV. Эти антитела планируется далее использовать для анализа экспрессии онкогена *sis* в первичных опухолях и метастазах человека.

Экспериментальная часть

В работе использованы производные аминокислот и реактивы фирм Fluka (Швейцария), Bachem (Швейцария), Koch-Light (Великобритания), Serva (ФРГ), Pierce (США), Protein Research Foundation (PRF, Япония), Reanal (ВНР), Merck (ФРГ). ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel 60 (Merck, кат. № 5724) в хроматографических системах, приведенных в табл. 1. ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Gradient HPLC System Model 334 (Beckman, США), использованы колонки Ultrasphere ODS (4,6×250 и 10,0×250 мм) фирмы Altex. В качестве детектирующего прибора при разделении колоночной хроматографией применялся Uvicord SD (LKB, Швеция). В качестве сорбентов для хроматографии в адсорбционном режиме использовали силикагель L 40/100 и силасорб 600 (30 мкм) (Chemapol, ЧССР). Температуры плавления (не исправлены) измерены на приборе Voëtius (ГДР). Удельное вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141 (США). Физико-химические константы полученных соединений приведены в табл. 2. Аминокислотный анализ кислотных гидролизатов пептидов осуществляли на приборе D-500 (Durrum, США). Гидролиз пептидов проводили стандартным способом (6 н. HCl, 110° С, 24 ч). Все используемые растворители предварительно перегоняли; растворители, применявшиеся при проведении реакций конденсации, абсолютировали обычным образом [12]. При проведении синтезов после промывки этилацетатные экстракты перед увариванием высушивали над безводным Na₂SO₄ или MgSO₄.

ELISA проводили на приборе Lab Systems Oy (Финляндия).

Иммунный комплекс выявляли с помощью антикроличьих козьих антител, конъюгированных с пероксидазой, и красителя ABTS (Sigma, США).

Используемые для радиоиммунопреципитации клетки HF-4-SSV и NRK-SSV метили [³⁵S]метионином (Amersham, Великобритания). Преципитационные комплексы осаждали белком А на сефарозе (Pharmacia, Швеция) и подвергали электрофорезу в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в присутствии додецилсульфата натрия в 12% полиакриламидном геле с последующей окраской и флуорографией гели. Иммуноблоттинг проводили по Таубину и сотр. [13]. Иммунопроявление проводили с помощью антикроличьих козьих антител, меченых пероксидазой, и проявляющего реагента (Bio-Rad, США).

Таблица 1

Состав систем для ТСХ

Растворитель	Объемные соотношения компонентов в системах									
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	
Гексан	1									
Этилацетат	1	3					1	3	2	
Хлороформ		9						8		
Метанол		2			1			2		
<i>n</i> -Бутанол			12	4		4				
Уксусная кислота			3			1		0,1	0,5	
Вода			5	1		1				
Пиридин				1		1				
Муравьиная кислота				1						
Бензол					4					
ТГФ									4	

Константы синтезированных соединений

Пептид	т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$, град (с в DMF)	R_f , система *
I	Гигроскоп.	-12,0 (0,2) **	0,17, Г; 0,10, Е
II	»	-37,0 (0,5) **	0,54, Г; 0,21, Е
IV	78-79	-52,0 (0,6)	0,51, Б; 0,78, В 0,30, Д
V	82-83	-45,0 (0,04)	0,28, Б; 0,59, Д
VI	149-150	-36,8 (0,3)	0,68, Е; 0,32, Б
VII	Масло	-11,9 (1,3)	0,51, Б; 0,64, Д
VIII	Аморфн.	-25,3 (0,2)	0,37, Б; 0,81, В
IX	67-68	-19,2 (0,5)	0,50, Б; 0,27, Д
X	73-74	-16,0 (0,5)	0,40, Б; 0,75, И
XI	87-88	-20,8 (0,3)	0,47, Б; 0,40, Д
XII	117-118	-20,0 (0,4)	0,48, Б; 0,55, В
XIV	Масло	-20,9 (0,35)	0,81, Б; 0,85, В
XV	»	-77,7 (0,13)	0,51, Б; 0,50, Д
XVI	Аморфн.	-36,7 (0,8)	0,52, Б; 0,34, Д
XVII	»	-52,6 (0,2)	0,67, Б; 0,42, Д
XVIII	79-80	-60,0 (0,2)	0,88, В; 0,60, Б
XIX	77-78	-21,3 (0,15)	0,36, Б; 0,53, З
XX	Аморфн.	-34,6 (0,13)	0,34, А; 0,83, Б
XXI	86-87	-15,8 (0,26)	0,35, Ж; 0,78, Б
XXII	Аморфн.	-34,9 (0,36)	0,82, В; 0,43, Б
XXIII	Масло	-23,0 (0,18)	0,38, Б; 0,30, Б
XXIV	Аморфн.	-32,2 (0,46)	0,27, В; 0,77, Е
XXV	119-120	-52,5 (0,32)	0,61, В

* Состав систем для ТСХ приведен в табл. 1.

** В H₂O.

1. *Woc-Pro-Pro-OBzl (III)*. К раствору 31,5 г (146,0 ммоль) Woc-Pro-OH в 70 мл DMF добавляли 18,7 мл (146,0 ммоль) NEM и после охлаждения до -15° С 19,1 мл (146,0 ммоль) изобутилхлорформиата, перемешивали 2-3 мин, затем по каплям прибавляли раствор, содержащий 29,5 г (122,0 ммоль) HCl·H-Pro-OBzl и 15,6 мл (122,0 ммоль) NEM в 70 мл THF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -15° С и 1 ч при 20° С, затем фильтровали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали 5% NaHCO₃ водной, 5% KHSO₄ и снова водой. Этилацетатный слой высушивали и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (35××1000 мм) с силикагелем, используя алюминирование в градиенте растворителей гексан-этилацетат. Выход пептида (III) 21,5 г (37%), $[\alpha]_D^{25} = 103,7^\circ$ (с 1, EtOAc) (лит. $[\alpha]_D^{25} = 103,63^\circ$ (с 1, EtOAc) [14]).

2. *Aoc-Arg(Tos)-Pro-Pro-OBzl (IV)*. 21,5 г (53,4 ммоль) дипептида (III) растворяли в 50% TFA в хлористом метиле, выдерживали 25 мин при 20° С, упаривали, сушили в вакууме над KOH. Выход трифторацетата (IIIa) 20,7 г (95%).

К раствору 19,1 г (43,2 ммоль) Aoc-Arg(Tos)-OH в 150 мл THF, охлажденному до -15° С, прибавляли 5,5 мл (43,2 ммоль) изобутилхлорформиата, перемешивали 2 мин, затем по каплям прибавляли раствор 20,7 г (50,0 ммоль) трифторацетата (IIIa) и 6,4 мл (50,0 ммоль) NEM в 70 мл THF. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при -15° С и 1 ч при 20° С, затем обрабатывали как в опыте 1. Масло, полученное после упаривания этилацетатного слоя, кристаллизовали из абс. эфира. Выход пептида (IV) 16,2 г (52%). Аминокислотный анализ: Pro 2,0 (2), Arg 1,0 (1).

3. *Aoc-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Pro-Pro-OBzl (V)*. 10,0 г (13,8 ммоль) трипептида (IV) растворяли в 50% TFA в хлористом метиле, выдерживали 15 мин при 20° С и упаривали. Остаток кристаллизовали из абс. эфира. Выход трифторацетата (IVa) 9,0 г (90%).

К раствору 3,3 г (7,4 ммоль) Aoc-Arg(Tos)-OH и 0,9 мл (7,3 ммоль) NEM в 60 мл THF, охлажденному до -15° С, добавляли 0,9 мл (7,4 ммоль) изобутилхлорформиата и через 1-2 мин раствор 6,0 г (8,3 ммоль) трифторацетата (IVa) и 1,0 мл (8,3 ммоль) NEM в 50 мл THF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -15° С и 1 ч при 20° С. Далее реакционную смесь обрабатывали как в опыте 2. Выход тетрапептида (V) 6,2 г (80%). Аминокислотный анализ: Arg 0,95 (2), Pro 1,00 (2).

4. *Aoc-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Pro-Pro-OH (VI)*. 4,0 г (3,8 ммоль) тетрапептида (V) растворяли в 100 мл трифторэтанола, добавляли палладиевую чернь и гидрировали 2 ч в токе водорода. Катализатор отфильтровывали и фильтрат упаривали. Выход пептида (VI) 3,5 г (88%).

5. *Aoc-Arg(Tos)-Lys(Z)-OBzl (VII)*. К раствору 10,1 г (22,8 ммоль) Aoc-Arg(Tos)-OH в 50 мл THF прибавляли 2,9 мл (22,8 ммоль) NEM, охлаждали до -15° С и добавляли 3,0 мл (22,8 ммоль) изобутилхлорформиата, перемешивали 2 мин и добавляли охлажденный раствор 9,7 г (24,0 ммоль) HCl·H-Lys(Z)-OBzl и 3,0 мл (24,0 ммоль) NEM

в 50 мл THF. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при -15°C и 1 ч при 20°C , обрабатывали как в опыте 1. Выход дипептида (VII) 10,5 г (60%).

6. *Boc-His(Bom)-Arg(Tos)-Lys(Z)-OBzl* (VIII). 14,4 г (18,5 ммоль) дипептида (V) растворяли в смеси TFA – AcOH (7:3), выдерживали 20 мин при 20°C , упаривали. Образовавшееся масло кристаллизовали из абс. эфира. Получили 10,5 г (73%) трифторацетата (VIIa).

Раствор 8,5 г (22,6 ммоль) *Boc-His(Bom)-OH* и 3,0 г (22,6 ммоль) *HOBT* в 50 мл DMF охлаждали до -10°C , добавляли раствор 4,6 г (22,6 ммоль) DCC в 20 мл DMF. Перемешивали 1 ч при 0°C , 1 ч при 20°C . Затем добавляли раствор 10,0 г (22,6 ммоль) трифторацетата (VIIa) и 2,9 мл (22,6 ммоль) NEM в 20 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 сут при 20°C , отфильтровывали и фильтрат упаривали. Остаток растворяли в этилацетате и отфильтровывали выпавшую *N,N'*-дициклогексильмочевину. Этилацетатный слой промывали как в опыте 1, сушили и упаривали. Получили 12,2 г (88%) трипептида (VIII). Аминокислотный анализ: His 0,95 (1), Arg 0,93 (1), Lys 1,00 (1).

7. *Boc-Lys(Z)-His(Bom)-Arg(Tos)-Lys(Z)-OBzl* (IX). 12,0 г (11,8 ммоль) пептида (VIII) растворяли в 150 мл смеси TFA – AcOH (7:3), выдерживали 1 ч при 20°C , упаривали с толуолом, остаток кристаллизовали из абс. эфира. Получили 11,2 г (90%) трифторацетата (VIIa).

К охлажденному до 0°C раствору 2,0 г (3,7 ммоль) *Boc-Lys(Z)-OPfp* [15] и 3,7 г (3,7 ммоль) трифторацетата (VIIa) в 10 мл THF добавляли 0,47 мл (3,7 ммоль) NEM. Реакционную смесь перемешивали 1 сут при 20°C , упаривали, остаток растворяли в этилацетате. Этилацетатный слой промывали как в опыте 1, сушили и упаривали. Получили 4,2 г (83%) тетрапептида (IX). Аминокислотный анализ: Lys 1,95 (2), His 0,93 (1), Arg 1,00 (1).

8. *Boc-Gly-Lys(Z)-His(Bom)-Arg(Tos)-Lys(Z)-OBzl* (X). 3,0 г (2,4 ммоль) тетрапептида (IX) растворяли в 40 мл смеси TFA – AcOH (7:3), выдерживали 40 мин при 20°C , упаривали. Образовавшееся масло кристаллизовали из абс. эфира. Кристаллы отфильтровывали, промывали абс. эфиром, сушили в вакууме над KOH. Получили 2,7 г (88%) трифторацетата (IXa).

Раствор 1,1 г (3,6 ммоль) *Boc-Gly-ONp*, 2,3 г (2,4 ммоль) соединения (IXa), 0,5 г (3,6 ммоль) *HOBT* и 0,3 мл (2,4 ммоль) NEM в 10 мл DMF перемешивали 1 сут при 20°C , затем добавляли 100 мкл 3-диметиламинопропиламина и перемешивали еще 5 ч. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 5% KHSO_4 , водой, 5% KHCO_3 , 3% NH_4OH , снова водой. Этилацетатный слой сушили, упаривали и хроматографировали на колонке (35×750 мм) с силикасорбом, используя градиентное элюирование в системе растворителей хлороформ – этилацетат (3:1) – хлороформ – этилацетат – метанол (9:3:2). Фракции, содержащие пептид, упаривали. Получили 2,0 г (84%) пентапептида (X). Аминокислотный анализ: Gly 1,00 (1), Lys 1,92 (2), His 0,91 (1), Arg 0,93 (1).

9. *Boc-Lys(Cl-Z)-Gly-Lys(Z)-His(Bom)-Arg(Tos)-Lys(Z)-OBzl* (XI). 1,1 г (7,6 ммоль) пентапептида (X) растворяли в 120 мл смеси TFA – AcOH (7:3), выдерживали 25 мин при 20°C , упаривали. Образовавшееся масло кристаллизовали из абс. эфира, выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали абс. эфиром, сушили в вакууме над KOH. Получили 1,0 г (92%) трифторацетата (XIa).

К охлажденному до 0°C раствору 0,35 г (0,85 ммоль) *Boc-Lys(Cl-Z)-OH* и 0,47 г (2,55 ммоль) *HOBT* в 10 мл THF прибавляли 0,18 г (0,85 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 1 ч при 20°C . Затем добавляли 0,73 г (0,53 ммоль) трифторацетата (XIa) и 68 мкл (0,53 ммоль) NEM. Реакционную смесь перемешивали 16 ч при 20°C , добавляли 100 мкл 3-диметиламинопропиламина и перемешивали еще 5 ч (до исчезновения следов активированного эфира). Затем к реакционной смеси добавляли 200 мл этилацетата, отфильтровывали *N,N'*-дициклогексильмочевину, фильтрат промывали 5% KHCO_3 , водой, 5% KHSO_4 , снова водой, упаривали. Остаток после упаривания хроматографировали на колонке (2,2×70 см) с силикасорбом, используя градиентное элюирование в системе хлороформ – этилацетат (3:1) – хлороформ – этилацетат – метанол (9:3:2). Выход гексапептида (XI) 0,60 г (66%). Аминокислотный анализ: Lys 2,90 (3), Gly 1,00 (1), His 0,92 (1), Arg 0,95 (1).

10. *Aoc - Arg(Tos)-Arg(Tos) - Pro-Pro - Lys(Cl-Z)-Gly-Lys(Z)-His(Bom)-Arg(Tos)-Lys(Z)-OBzl* (XII). 0,50 г (0,30 ммоль) гексапептида (XI) растворяли в 1 мл AcOH и добавляли 148 мкл (1,21 ммоль) $\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$. Через 1 ч добавляли еще 50 мкл (0,41 ммоль) $\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$. Через 10 мин реакционную смесь выливали в 100 мл охлажденного 6% раствора ацетата натрия. Образовавшееся масло промывали водой, отделяли, растворяли в 5 мл диоксиана и лиофилизировали. Получили 0,35 г (70%) ацетата (XIa).

К охлажденному до -20°C раствору, содержащему 400 мг (0,43 ммоль) тетрапептида (VI), 668 мг (0,43 ммоль) ацетата (XIa), 58 мг (0,43 ммоль) *HOBT* и 48 мкл (0,43 ммоль) *NMM* в 15 мл DMF, добавляли 182 мг (0,43 ммоль) мето-*n*-толуолсульфоната 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодимида. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -5°C , 16 ч при 20°C , добавляли 50 мкл AcOH и хроматографировали на колонке (2,5×50 см) с гелем *Toyo-Pearl* HW-40 (тонкий) (*Toyo-Soda*, Япония) в DMF – AcOH (450:1). Выход декапептида (XII) 0,83 г (75%). Аминокислотный анализ: Arg 2,95 (3), Pro 1,87 (2), Lys 2,91 (3), Gly 1,00 (1), His 0,95 (1).

11. *H-Arg-Arg-Pro-Pro-Lys-Gly-Lys-His-Arg-Lys-OH*·8 TFA (I). 35 мг (13,6 мкмоль) декапептида (XII) обрабатывали HF – PhMe (9:1) в приборе фирмы *Protein Research Foundation* (Япония) 1 ч при 0°C . HF упаривали, к остатку добавляли абс. эфир, выпавший осадок центрифугировали, промывали абс. эфиром, сушили в

вакууме, растворяли в 0,1 н. АсОН и хроматографировали на колонке (1,5×40 см, элюент — 0,1 н. АсОН) с сефадексом G-15. Далее декапептид (I) очищали ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (5 мкм, 1, 0×25 см; Altex, США), используя градиентное элюирование ацетонитрилом (0→40%) в 0,1% растворе ТФА в Н₂O. Получили 7,2 мг (24,4%) трифторацетата пептида (I). Аминокислотный анализ: Arg 2,97 (3), Pro 1,95 (2), Lys 2,99 (3), Gly 1,00 (1), His 0,97 (1).

12. *Voc-Pro-Pro-OPcp (XIII)*. 20,0 г (43,1 ммоль) Voc-Pro-OPcp растворяли в 200 мл смеси ТФА — АсОН (1 : 1), выдерживали 40 мин при 20° С, упаривали. Образовавшееся масло кристаллизовали из абс. эфира. Кристаллы отфильтровывали, промывали абс. эфиром, сушили в вакууме. Получили 19,6 г (95%) ТФА-Н-Pro-OPcp.

К охлажденному до -15° С раствору 9,0 г (41,8 ммоль) Voc-Pro-ОН и 5,4 мл (41,8 ммоль) NEM в 40 мл THF добавляли 5,5 мл (41,8 ммоль) изобутилхлорформата, перемешивали 3 мин, затем по каплям прибавляли раствор 19,9 г (41,8 ммоль) ТФА-Н-Pro-OPcp и 5,4 мл (41,8 ммоль) NEM в 100 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 2 ч при -10° С и 1 ч при 20° С. Далее реакцию смесь обрабатывали как в опыте 1. Выход дипептида (XIII) 8,2 г (35%), т. пл. 90–91° С (89–91° С [16]).

13. *Voc-Lys(Z)-Gly-OBzl (XIV)*. К охлажденному до 0° С раствору 10,0 г (18,3 ммоль) Voc-Lys(Z)-OPip и 6,1 г (18,3 ммоль) TosOH-Н-Gly-OBzl в 25 мл DMF добавляли 2,3 мл (18,3 ммоль) NEM. Реакционную смесь перемешивали 2 сут при 20° С, упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 5% KHSO₄ водной, 5% KНСО₃, снова водой, сушили, упаривали, остаток промывали гексаном. Получили 3,5 г (87%) дипептида (XIV).

14. *Voc-Pro-Pro-Lys(Z)-Gly-OBzl (XV)*. 7,0 г (31,3 ммоль) дипептида (XIV) растворяли в 100 мл смеси ТФА — АсОН (7 : 3) и выдерживали 20 мин при 20° С, упаривали, остаток кристаллизовали из абс. эфира. Выход трифторацетата (XIVa) 7,0 г (95%).

Раствор 16,5 г (29,5 ммоль) дипептида (XIII), 4,0 г (29,5 ммоль) НОВt, 7,0 г (29,5 ммоль) трифторацетата (XIVa) и 3,8 мл (29,5 ммоль) NEM в 20 мл DMF перемешивали 2 сут при 20° С. Далее реакцию смесь обрабатывали как в опыте 13. Получили 19,2 г (90%) тетрапептида (XV). Аминокислотный анализ: Pro 1,94 (2), Lys 0,95 (1), Gly 1,00 (1).

15. *Voc-Arg(Z₂)-Pro-Pro-Lys(Z)-Gly-OBzl (XVI)*. 6,0 г (8,3 ммоль) тетрапептида (XV) растворяли в 70 мл смеси ТФА — АсОН (7 : 3), выдерживали 25 мин при 20° С, упаривали. Образовавшееся масло многократно промывали абс. эфиром, сушили в вакууме над КОН. Получили 5,8 г (95%) трифторацетата (XVa).

К охлажденному до -5° С раствору 5,7 г (10,4 ммоль) Voc-Arg(Z₂)-ОН, 7,7 г (10,4 ммоль) трифторацетата (XVa), 1,4 г (10,4 ммоль) НОВt и 1,3 мл (10,4 ммоль) NEM в 10 мл THF добавляли 2,0 г (10,4 ммоль) хлоргидрата 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодимид. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -5° С, ночь при 20° С, упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 5% KНСО₃ водной, 10% лимонной кислотой, снова водой. Этилацетатный слой сушили и упаривали. Получили 10,8 г (90%) пептида (XVI). Аминокислотный анализ: Arg 0,98 (1), Pro 1,95 (2), Lys 1,03 (1), Gly 1,00 (1).

16. *Voc-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Pro-Lys(Z)-Gly-OBzl (XVII)*. 2,0 г (3,7 ммоль) пептида (XVI) растворяли в 25 мл смеси ТФА — АсОН (7 : 3), выдерживали 40 мин при 20° С, упаривали. Образовавшееся масло растирали с абс. эфиром до кристаллизации. Выпавшие кристаллы отфильтровывали. Получили 1,8 г (89%) трифторацетата (XVIa).

К охлажденному до -5° С раствору 0,79 г (1,46 ммоль) Voc-Arg(Z₂)-ОН, 1,70 г (1,46 ммоль) трифторацетата (XVIa), 0,20 г (1,46 ммоль) НОВt и 187 мкл (1,46 ммоль) NEM в 10 мл THF добавляли 0,23 г (1,46 ммоль) хлоргидрата 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодимид. Реакционную смесь обрабатывали как в опыте 15. Полученный остаток растворяли в 90 мл трифторэтанола и добавляли 10 мл дистиллированной воды. Этот раствор пропустили через 25 г анионита AG1×2 (200–400 меш, Bio-Rad, США) в ацетатной форме до полного удаления Voc-Arg(Z₂)-ОН. После очистки на смоле раствор упаривали. Получили 2,1 г (90%) гексапептида (XVII). Аминокислотный анализ: Arg 1,95 (2), Pro 1,97 (2), Lys 1,02 (1), Gly 1,00 (1).

17. *Voc-Val-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Pro-Lys(Z)-Gly-OBzl (XVIII)*. 2,0 г (1,3 ммоль) гексапептида (XVII) растворяли в 20 мл смеси ТФА — АсОН (7 : 3), через 35 мин упаривали, образовавшееся масло кристаллизовали из смеси абс. эфира с гексаном (1 : 1). Выход трифторацетата (XVIIIa) 1,9 г (95%).

К охлажденному до 0° С раствору 0,56 г (1,8 ммоль) Voc-Val-ONSu [17] и 1,80 г (1,1 ммоль) трифторацетата (XVIIIa) в 5 мл DMF добавляли 145 мкл (1,1 ммоль) NEM. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С, ночь при 20° С и подвергали гель-хроматографии на колонке (2,5×80 см) с сефадексом LH-20 в смеси DMF — АсОН (450 : 1). Получили 1,70 г (90%) гептапептида (XVIII). Аминокислотный анализ: Val 0,95 (1), Arg 1,93 (2), Pro 1,92 (2), Lys 1,07 (1), Gly 1,00 (1).

18. *H-Val-Arg-Arg-Pro-Pro-Lys-Gly-4 TFA (II)*. 50,0 мг (29,9 мкмоль) гептапептида (XVIII) растворяли в 10 мл ТФА и пропускали через полученный раствор ток сухого НВг в течение 20 мин. Реакционную смесь упаривали, остаток промывали абс. эфиром, растворяли в 10 мл 0,1 н. АсОН, полученный раствор перемешивали 10 мин с 0,25 г смолы AG 1×2 (200–400 меш, Bio-Rad) в ацетатной форме. Смолу отделяли, раствор лиофилизовали. Далее пептид хроматографировали на колонке (1,5×45 см) с сефадексом G-15 в 0,1 н. АсОН и окончательно очищали ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (1,0×25 см, 5 мкм), используя градиентное элюирование ацетонитрилом (0→40%) в 0,1% ТФА. Получили 12,0 мг (32%) пептида (II). Аминокислотный анализ: Val 0,98 (1), Arg 1,95 (2), Pro 1,97 (2), Lys 1,01 (1), Gly 1,00 (1).

19. *Z-Arg(Z₂)-Arg(Adc₂)-OH (XIX)*. К раствору, содержащему 2,9 г (5,0 ммоль) *H-Arg(Adc₂)-OH·H₂O [10]*, 3,5 г (5,0 ммоль) *Z-Arg(Z₂)-ONSu [17]* в смеси 40 мл THF и 40 мл DMF, добавляли 0,64 мл (5,0 ммоль) NEM и перемешивали 1 ч при 0°С и 15 ч при 20°С. Реакционную смесь упаривали, образовавшееся масло растворяли в 10 мл метанола и выливали в 5% лимонную кислоту. Получившуюся суспензию центрифугировали, осадок отделяли, сушили в вакууме над P₂O₅, растворяли в хлороформе и хроматографировали на колонке (2,5×70 см) с силикагелем, элюент — хлороформ. Получили 2,9 г (53%) дипептида (XIX).

20. *Z-Arg(Z₂)-Arg(Adc₂)-ONSu (XX)*. Раствор 1,10 г (1,0 ммоль) дипептида (XIX), 0,12 г (1,0 ммоль) *N*-оксисукцинимид в 10 мл THF охлаждали до 0°С и добавляли 0,21 г (1,0 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°С и 1 сут при 20°С. Выпавшую *N*, *N'*-дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали и хроматографировали как в опыте 19. Получили 0,81 г (66%) активированного эфира (XX).

21. *Z-Lys-(Boc)-Gly-OMe (XXI)*. Раствор 5,0 г (10,0 ммоль) *Z-Lys(Boc)-ONp*, 1,8 г (15,0 ммоль) *HCl·H-Gly-OMe* и 1,6 мл (15,0 ммоль) NMM в 5 мл DMF перемешивали 1 сут при 20°С. К реакционной смеси добавляли этилацетат, промывали 10% лимонной кислотой, водой, 3% NH₄OH, снова водой. Этилацетатный слой сушили и упаривали. Получили 3,6 г (81%) дипептида (XXI).

22. *Z-Lys(Boc)-Gly-OH (XII)*. К раствору 3,0 г (6,6 ммоль) дипептида (XXI) в 25 мл метанола добавляли 12,5 мл (12,5 ммоль) 1 н. NaOH. Реакционную смесь перемешивали 2 ч, подкисляли лимонной кислотой до pH 4–5, упаривали, выпавшее масло экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный слой промывали водой, сушили и упаривали. Получили 2,3 г (79%) дипептида (XII).

23. *H-Lys(Boc)-Gly-OH·HCOOH (XXIII)*. К раствору 1,0 г (2,3 ммоль) дипептида (XII) в 10 мл метанола добавляли 0,1 мл HCOOH и гидрировали 2 ч в токе водорода в присутствии палладиевой черни. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Получили 0,8 г (100%) соединения (XXIII).

24. *Z-Pro-Pro-Lys(Boc)-Gly-OH (XXIV)*. К охлажденному до 0°С раствору 5,0 г (14,4 моль) *Z-Pro-Pro-OH [18]* и 1,8 г (15,8 ммоль) *N*-оксисукцинимид в 10 мл абс. пиридина добавляли 3,0 г (14,4 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°С и 1 сут при 20°С, затем добавляли 5,0 г (14,4 ммоль) соединения (XXIII) и 1,8 мл (14,4 ммоль) NEM. Реакционную смесь перемешивали 2 сут при 20°С, подкисляли 10% лимонной кислотой. Выпавшее масло экстрагировали этилацетатом, сушили, упаривали, остаток хроматографировали на колонке (2,5×80 см) с силикагелем, используя градиентное элюирование в системе хлороформ–метанол. Получили 4,8 г (50%) тетрапептида (XXIV). Аминокислотный анализ: Pro 1,94 (2), Lys 0,98 (1), Gly 1,00 (1).

25. *H-Pro-Pro-Lys(Boc)-Gly-HCOOH (XXV)*. 3,0 г (4,5 ммоль) тетрапептида (XXIV) растворяли в 24 мл DMF, добавляли 100 мкл HCOOH и гидрировали 2 ч в токе водорода над палладиевой чернью. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Получили 2,3 г (95%) пептида (XXV).

26. *Конъюгация пептидов с белками-носителями*. 5 мг пептида (I) или (II) инкубировали 15 мин при 0°С с 5 мг мето-*n*-толуолсульфоната 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимидом (Pierce, США) в 1 мл H₂O, подкисленной HCl, до pH 3,0. Затем добавляли раствор 5 мг белка-носителя KLN или BSA в 0,5 мл дистиллированной воды и доводили pH до 9,0 добавлением NH₄HCO₃. Полученную смесь перемешивали 3 ч, переносили в диализные ленты и диализовали 3 сут при 4°С против дистиллированной воды.

Авторы выражают свою признательность П. В. Костецкому и В. В. Ульяхину за расчет вторичной структуры и профиля гидрофильности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Robbins K. C., Devare S. G., Reddy E. P., Aaronson S. A. // Science. 1982. V. 218. № 4577. P. 1131–1133.
2. Devare S. G., Reddy E. P., Law J. D., Robbins K. C., Aaronson S. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 3. P. 731–735.
3. Doolittle R. F., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Devare S. G., Robbins K. C., Aaronson S. A., Antoniadis H. N. // Science. 1983. V. 221. № 4607. P. 275–277.
4. Waterfield M. D., Scrace G. T., Whittle N., Stroobant P., Johnsson A., Westermarck B., Heldin C. N., Huang I. S., Deuel T. F. // Nature. 1983. V. 304. № 5924. P. 35–39.
5. Chiu I. M., Reddy E. P., Givol D., Robbins K. C., Tronick S. R., Aaronson S. A. // Cell. 1984. V. 37. № 1. P. 123–129.
6. Josephs S. F., Guo C., Ratmer L., Wong-Staal F. // Science. 1984. V. 223. № 4635. P. 487–490.
7. Kyte J., Doolittle R. F. // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. № 1. P. 105–132.
8. Hopp T. P., Woods K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824–3828.
9. Chou P. Y., Fasman G. D. // Adv. Enzymol. 1978. № 1. P. 45–148.
10. Jager G., Geiger R. // Chem. Ber. 1970. B. 103. № 4. S. 1727–1747.
11. Robbins K. C., Antoniadis H. N., Devare S. G., Hunkapiller M. W., Aaronson S. A. // Nature. 1983. V. 305. № 5935. P. 605–608.

12. Стюарт Д., Янг Д. Твердофазный синтез пептидов. М.: Мир, 1971. С. 76–77.
13. Towbin H., Stachelin T., Gordon J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 9. P. 4350–4351.
14. Wang S.-S., Gesin B. F., Winter D. P., Makefske R., Kulesha I. D., Tzougraki C., Meienhofer J. // J. Org. Chem. 1977. V. 42. № 8. P. 1286.
15. Kisfaludy L., Löw M., Nyeki O., Szirtes R., Schön I. // Lieb. Ann. 1973. № 5. P. 1421–1429.
16. Вольпина О. М., Дейгин В. И., Михалева И. И., Иванов В. Т. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 8. С. 1133–1154.
17. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V. 86. № 3. P. 1839–1842.
18. Nishimura O., Fujino M. // Chem. Pharm. Bull. 1976. V. 24. № 7. P. 1568–1575.

Поступила в редакцию

27.X.1986

После доработки

26.II.1987

SYNTHESIS AND IMMUNOGENIC PROPERTIES OF PEPTIDES CORRESPONDING TO 200 — 210 SEQUENCE OF p28^{sis} ONCOPROTEIN

ANTONENKO V. V., PRUDCHENKO I. A., MIKHALEVA I. I.,
MAZURENKO N. N.*, KISELEV F. L.*

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR; * Institute of Cancerogenesis, All-Union Cancer Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Synthesis of peptides corresponding to the 201–210 and 200–206 sequences of p28^{sis} oncoprotein is reported. This region of the oncoprotein was chosen as a probable epitope basing on the analysis of its secondary structure and hydrophilicity profile. The synthesis was carried out by classical method in solution using side-protecting groups of the benzyl type. Conjugates of the peptides with protein carriers and polyclonal antibodies to the peptides were obtained. Antiserum against the 201–210 peptide conjugate is shown to be specific to p28^{sis} oncoprotein and its p56^{sis} dimer.