



УДК 547.466.96:602.017.1-018+616-097

СИНТЕЗ ЭТИЛАМИДА ЦИКЛИЧЕСКОГО УНДЕКАПЕПТИДА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 593 - 603 ТРАНСМЕМБРАННОГО ГЛИКОПРОТЕИНА gp-41 ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ВТОРОГО ТИПА

© 1995 г. М. В. Сидорова*, Е. В. Кудрявцева, А. С. Молокоедов, М. В. Овчинников, Ж. Д. Беспалова

Кардиологический научный центр Российской академии медицинских наук, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15-а

Поступила в редакцию 18.11.94 г. После доработки 20.01.95 г.

Классическими методами пептидной химии в растворе осуществлен синтез этиламида циклического дисульфида пептидного антигена ВИЧ-2, соответствующего последовательности 593 - 603 белка gp-41. Показано отсутствие рацемизации при фрагментарной конденсации. Проведено сравнение различных методов образования дисульфидной связи.

Ключевые слова: антигенная детерминанта ВИЧ-2, фрагментная конденсация, рацемизация, дисульфидная связь, побочные реакции.

В настоящее время пептиды находят широкое применение в диагностике таких вирусных заболеваний, как СПИД [1, 2], Т-клеточный лейкоз (лимфома) [3], гепатит [4].

Преимущества пептидных диагностикумов общеизвестны – это высокая специфичность, возможность работы с индивидуальными, достаточно устойчивыми и легко стандартизируемыми антигенами.

Данная работа посвящена оптимизации синтеза ундекапептида, соответствующего последовательности 593 - 603 трансмембранного гликопротеина gp-41 вируса иммунодефицита человека 2-го типа (ВИЧ-2):



Этот пептид является фрагментом иммунодоминантной области указанного белка и, как показано в работе [5], обладает высокой специфичностью к сыворотке крови пациентов, инфицированных

ВИЧ-2, и совершенно нечувствителен к сыворотке крови пациентов, инфицированных ВИЧ-1. Разработка оптимальной схемы синтеза данного пептида имеет принципиальное значение, так как на сегодняшний день это единственный антиген, входящий в состав диагностического набора "Пептоскрин", который отвечает за выявление антител к ВИЧ-2.

С-Концевая карбоксильная группа выбранного пептида была модифицирована этиламином. Введение этиламидной группировки, выполняющей в ходе синтеза роль защиты С-концевой карбоксильной функции, позволяет существенно упростить выделение промежуточных продуктов. Кроме того, такая модификация увеличивает липофильность пептида и, по-видимому, должна улучшить его сорбцию на полистирольных планшетах, что особенно важно при использовании пептида в системе твердофазного иммуноферментного анализа.

Для синтеза вышеназванного пептида был выбран метод фрагментной конденсации в растворе, который в случае относительно коротких пептидов обеспечивает быстрое получение достаточно больших количеств целевого вещества. Синтезируемая последовательность была разбита на три фрагмента (рис. 1). Выбор фрагмента с С-концевым остатком глицина традиционен. При выборе второго фрагмента мы руководствовались данными [6] о возможности успешной, с высоким выходом и отсутствием рацемизации, конденсации

Использованы сокращения, рекомендованные комиссией ИУРАС-ИУВ (Eur. J. Biochem. 1984. V. 183. P. 9 - 37), а также: Asp – ацетамидометил, Boc – трет-бутилоксикарбонил, Bscf – трет-бутил, DMF – N,N-диметилформамид, DCC – N,N-дициклогексилкарбодимид, ESI-MS – electro-spray ionisation mass spectrometry, HOBt – 1-гидроксибензотриазол, HONB – N-гидроксибензотриазол-2,2,1-гепт-5-ен-2,3-дикарбоксимид, DCHA – дициклогексилламин, HONp – 4-нитрофенол, HONSa – N-гидроксисукцинимид, TFA – трифторуксусная кислота, Z – бензилоксикарбонил, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита.

* Автор для переписки.

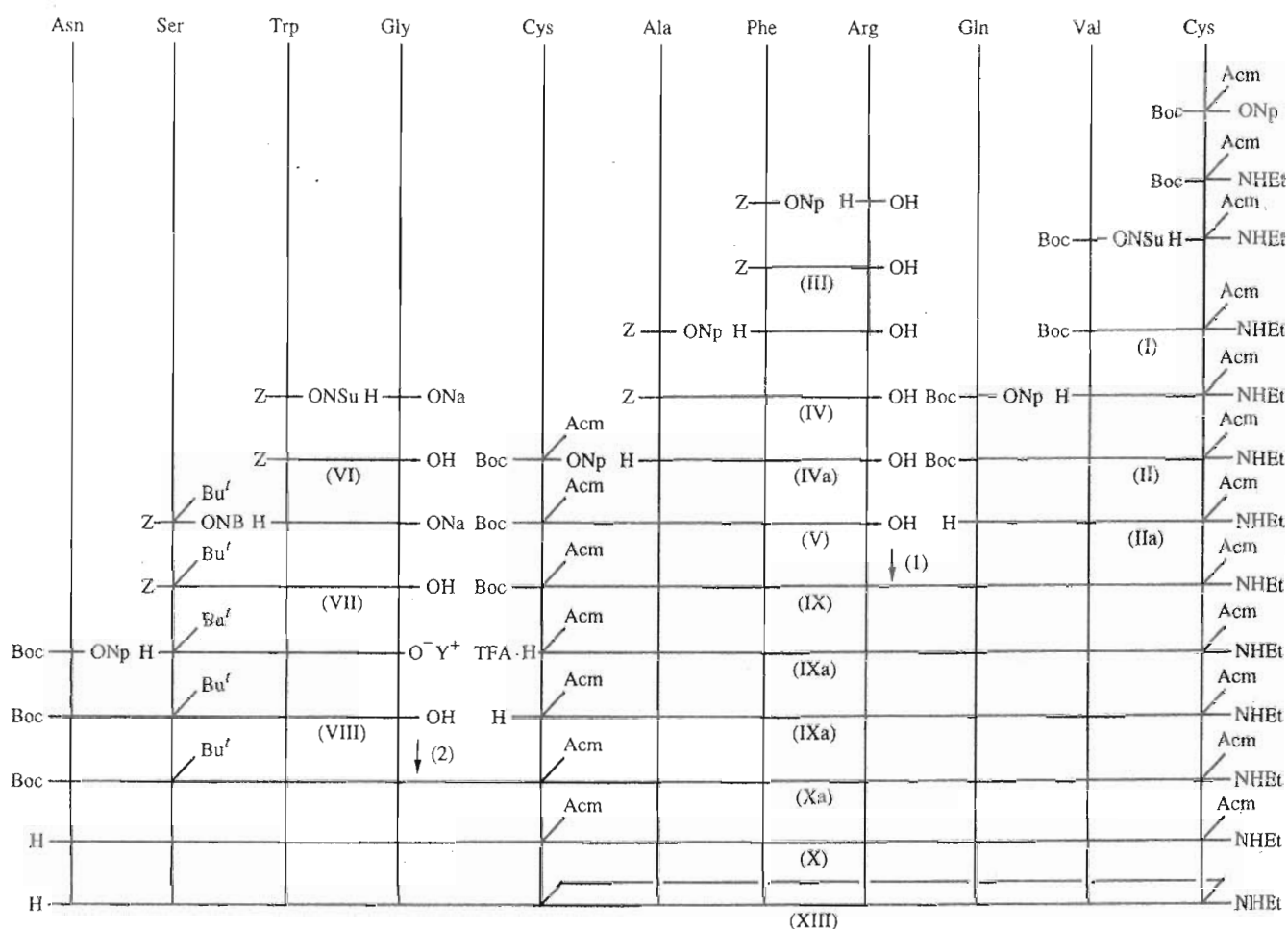


Рис. 1. Схема синтеза ундекапептида. (1) – HBr · Py, DCC/HOBT; (2) – DCC/HOBT; Y⁺ – ⁺N(CH₃)₃CH₂C₆H₅.

фрагментов с С-концевым N^G-незащищенным аргинином. Такой вариант фрагментации привлекателен еще и тем, что при получении фрагментов с С-концевым незамещенным аргинином исключаются трудоемкие и плохо воспроизводимые стадии введения и удаления защит на гуанидиновую и карбоксильную функции этой аминокислоты.

Для временного блокирования α-аминогрупп использовались бензилоксикарбонильная и *трет*-бутилоксикарбонильная защиты, которые в дальнейшем удалялись каталитическим гидролизом и ацидолизом соответственно. Сульфгидрильная функция цистеина блокировалась ацетамидометильной группой, а гидроксильная функция серина – *трет*-бутильной защитой.

При синтезе пептидных фрагментов (V) и (VIII) карбоксильные группы остатков аргинина и глицина защищали солеобразованием. Это ограничило выбор метода образования пептидной связи и свело его к применению активированных эфиров, позволяющих работать с минимумом защитных групп. Этот метод образования пептидов ис-

пользовался и при получении фрагмента (II). Нами применялись N-гидроксисукцинимидные, *n*-нитрофениловые эфиры и хорошо кристаллизующийся N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимидный эфир для присоединения остатка серина.

При синтезе фрагмента (V), как уже упоминалось, исходили из незамещенного аргинина. Присоединение *n*-нитрофениловых эфиров Z-аминокислот проводили в безводном DMF. Для очистки промежуточных N-защищенных пептидов был использован оригинальный метод хроматографии на силикагеле [7], позволяющий быстро и эффективно выделять из реакционной смеси достаточно большие количества аргининсодержащих пептидов. В качестве элюента использовалась смесь спирта и хлороформа. Характерной особенностью данного способа являются необычно высокая емкость силикагеля по отношению к аргининсодержащим пептидам (на колонке с 1 г сорбента можно разделить приблизительно 1 г смеси продуктов реакции) и возможность выделения продукта без размыкания внутримолекулярной соли между гуанидиновой и карбоксильной

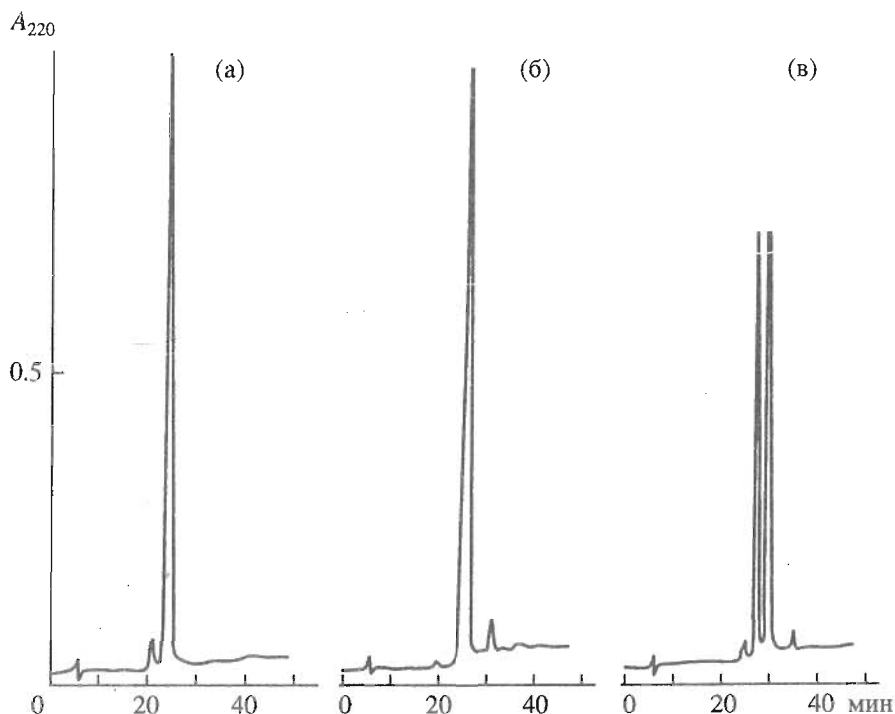


Рис. 2. ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (7 → 42% за 50 мин) в 0.05 М KH_2PO_4 (рН 3) диастереомерных гептапептидов: гептапептид (XII), содержащий *D*-аргинин (а); гептапептид (IX), содержащий *L*-аргинин (б); смесь диастереомеров (в). Скорость элюции 1 мл/мин.

группами аргинина. При этом выходы целевых соединений были высокими (82 - 91%).

В ходе синтеза фрагмента (VIII) при получении ди- (VI) и трипептида (VII) исходили из натриевых солей соответствующих аминокислот, а реакцию конденсации проводили в водно-органической среде. При получении тетрапептида (VIII) исходили из растворимой в DMF бензилтриметиламмониевой соли аминокислоты, а реакцию конденсации проводили в безводной среде с целью предотвращения возможности омыления *n*-нитрофенилового эфира и гидролиза амидной функции аспарагина в водно-щелочных условиях.

Для конденсации синтезированных блоков применялся карбодимидный метод с добавками НОВТ или пентафторфенола, хорошо зарекомендовавший себя как в классическом, так и в твердофазном варианте синтеза для соединения фрагментов [8, 9]. Конденсацию аргининсодержащего тетрапептида (V) с соответствующим аминокислотным компонентом (IIIa) проводили DCC/НОВТ-методом в DMF в присутствии 1 экв. бромгидрата пиридина, необходимого для размыкания внутримолекулярной соли в карбоксильном компоненте и протонирования его гуанидиновой группы [6]. При этом выход продукта конденсации (IX) составил 90%. Для оценки рацемизации остатка аргинина при проведении фрагментарной конденсации нами был получен аналог соединения (IXa), содержащий

D-аргинин (соединение (XII), см. "Экспериментальную часть"). С помощью ВЭЖХ на обращенной фазе было показано, что целевой гептапептид *L*-конфигурации практически не содержит примеси диастереомера (рис. 2). Таким образом, полученные нами результаты хорошо согласуются с литературными данными [6] об отсутствии рацемизации при конденсации фрагментов с *C*-концевым незамещенным аргинином указанным выше способом.

Конденсация соединений (VIII) и (IXa) проводилась также карбодимидным методом в присутствии НОВТ. Однако выход продукта был ниже, чем в первом случае (55 - 65%). По данным ВЭЖХ, пептид (X) содержал примесь аминокислоты (гептапептида) в количестве 5 - 10%. Применение другого конденсирующего агента - комплекса F, увеличение избытка карбоксильного компонента до 1.3 - 1.5 экв., добавление в реакционную смесь *N*-метилпирролидона, увеличивающего растворимость исходных компонентов и продукта, не привели к существенному повышению выхода.

Защитные группы конечного ундекапептида (Xa) отщепляли действием TFA. Для очистки полученного соединения были параллельно использованы ВЭЖХ на обращенной фазе и ионообменная хроматография на сульфопропил-сефадексе (SP-сефадекс) в градиенте концентрации пиридин-ацетатного буфера от 0.05 до 1 М. Следует

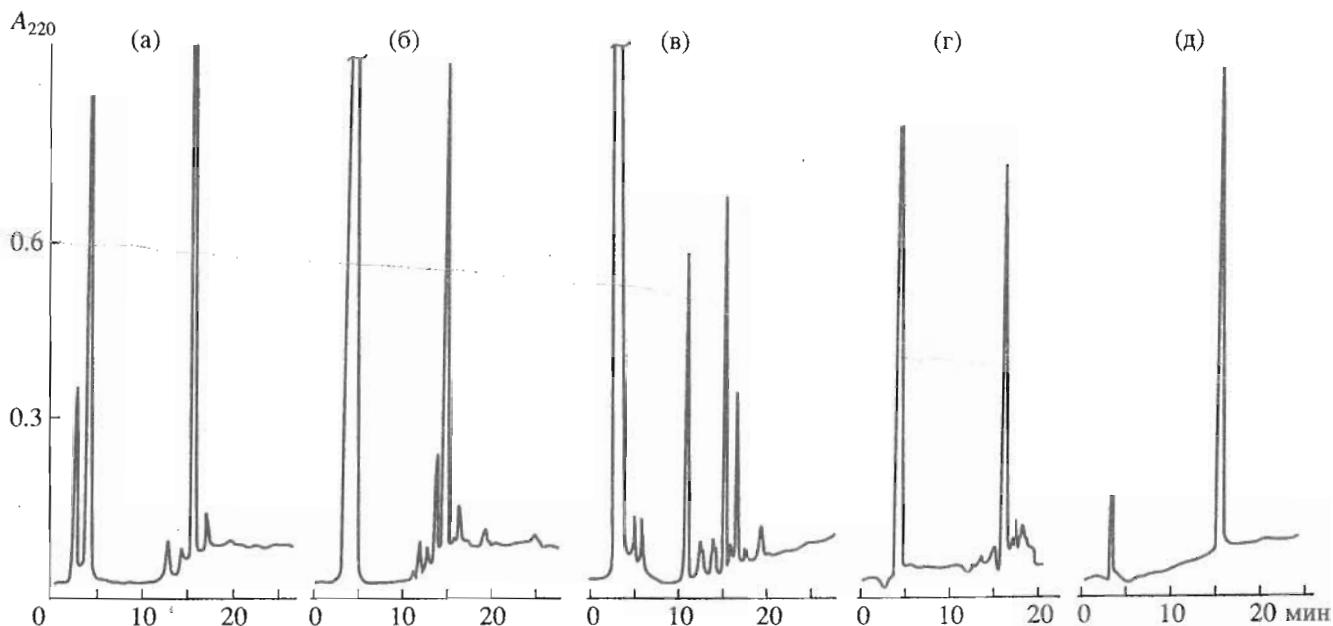


Рис. 3. ВЭЖХ реакционной смеси при окислении соединения (X) следующими реагентами: а – $\text{Hg}(\text{OAc})_2/\text{H}_2\text{O}_2$; б – $\text{Ag}(\text{CF}_3\text{COO})/\text{H}_2\text{O}_2$; в – I_2/AcOH ; г – I_2/MeOH . д – ВЭЖХ конечного продукта. Колонка Ultrasphere ODS (4.6×250 мм), элюция градиентом концентрации ацетонитрила ($14 \rightarrow 56\%$ за 40 мин) в $0.05 \text{ M } \text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 3) со скоростью потока 1 мл/мин.

отметить, что оба метода очистки давали сравнимые результаты и обеспечивали получение вещества заданной чистоты.

Заключительным этапом работы была оптимизация условий деблокирования сульфгидрильных групп цистеина и замыкания дисульфидной связи. Несмотря на многообразие способов отщепления S-Асм-защит и циклизации, в каждом конкретном случае выбор соответствующих реагентов представляет собой отдельную задачу. Следует также отметить, что выходы циклических дисульфидов часто невелики и составляют 5 - 50% [10, 11]. Нами были испытаны различные способы отщепления Асм-защит и последующей циклизации (таблица и рис. 3). При этом оказалось, что лучшие результаты получаются при использовании ацетата ртути [12] (2 экв. на каждую SH-группу) в 30% AcOH с последующим замыканием дисульфидной связи при pH 6.8 - 7.0 в присутствии перекиси водорода при концентрации пептида 0.9 - 1 мг/мл. В этих условиях реакции деблокирования и циклизации протекали однозначно и практически нацело, судя по данным ВЭЖХ. Выход целевого продукта был высоким – 85%.

При использовании 20 экв. трифторацетата серебра для деблокирования цистеина [13] содержание циклического пептида в реакционной смеси, по данным ВЭЖХ, и выход конечного продукта (60%) были ниже. Возможно, снижение выхода в данном случае частично обусловлено механическими потерями вещества на стадии выделения

SH-производного. В отличие от экспериментов с ацетатом ртути, где для удаления ртути использовали сероводород, ионы серебра удаляли с помощью 50-кратного избытка этандитиола с последующим отделением низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией на сефадексе G-15 в 10% уксусной кислоте.

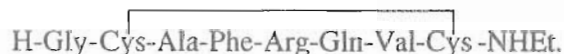
Прямое окислительное превращение S-Асм-защищенного пептида в соответствующий циклический дисульфид осуществляли при помощи иода в водной уксусной кислоте [11]. Избыток иода удаляли разными способами: 10% раствором тиосульфата натрия (методика “в”), 10% раствором аскорбиновой кислоты (методика “г”). В любом случае окисление иодом приводило к смеси продуктов, в которой содержание основного вещества составляло 28% (в случае тиосульфата) и 26% (в случае аскорбиновой кислоты), а количество примеси было сопоставимо с количеством целевого продукта и составляло 30 и 28% соответственно (см. рис. 3). Реакционные смеси были разделены ВЭЖХ, полученные вещества были проанализированы при помощи аминокислотного анализа и ESI-MS. Было показано, что при окислении иодом в водной уксусной кислоте независимо от способа удаления избытка иода наряду с основными процессами отщепления Асм-групп и образования дисульфидной связи протекает реакция более глубокого окисления, приводящая к расщеплению пептидной связи по остатку триптофана, что, как известно из работы [14],

Сравнение методов замыкания дисульфидной связи соединения (X)

Методика*	Способ удаления Асм-защит	Способ окисления (рН)	Концентрация пептида, мг/мл	Содержание вещества (X) в реакционной массе (ВЭЖХ, %)	Выход продукта, %	Номер рисунка
а	1. Hg(OAc) ₂ , 30% AcOH 2. H ₂ S	H ₂ O ₂ (6.8)	0.9	90.4	85	3а
б	1. Ag(CF ₃ COO), CF ₃ COOH, анизол 2. Эгандитиол	H ₂ O ₂ (7.0)	1.0	74.9	60	3б
в	1. I ₂ /AcOH 2. Na ₂ S ₂ O ₃	I ₂ (3.0)	0.9	27.6	28	3в
г	1. I ₂ /AcOH 2. Аскорбиновая к-та	I ₂ (3.0)	0.8	27.6	26	—
д	1. I ₂ /MeOH 2. Na ₂ S ₂ O ₃	I ₂ (6.0)	0.2	82.4	66	3г

* См. "Экспериментальную часть".

возможно в кислых условиях в присутствии окислителей. Полученный побочный продукт, по данным аминокислотного анализа, не содержал трех N-концевых аминокислот, а его молекулярная масса соответствовала молекулярной массе циклического октапептида:



При удалении иода тиосульфатом натрия получали еще один побочный продукт, аминокислотный состав которого соответствовал аминокислотному составу целевого ундекапептида, а молекулярная масса составляла 1407 Да и была на 112 единиц больше молекулярной массы целевого продукта. Так как разница в массе соответствует молекулярной массе аниона S₂O₃²⁻, а полученное соединение имеет корректный аминокислотный состав, мы предположили, что это продукт взаимодействия целевого пептида с тиосульфатом. Склонность серы к образованию полимерных структур, содержащих -S-O-связи, известна [15]. Наше предположение подтверждается элементным анализом данной примеси на содержание серы. Если в целевом продукте теоретическое содержание серы составляет 4.45%, то в соединении с предполагаемой нами структурой оно должно составлять 7.83%. По результатам элементного анализа, содержание серы в полученной нами примеси составляет 7.95%.

Нами была также опробована методика окисления иодом в водном метаноле [12]. В этом случае реакция замыкания дисульфидной связи протекала без образования побочных продуктов с выходом 66%. Таким образом, применительно к

синтезируемому пептиду наиболее подходящие условия при окислении иодом – высокое разбавление реакционной смеси (0.2 мг/мл), отсутствие кислорода воздуха, нейтральные значения рН.

Таким образом, нами разработан удобный способ синтеза пептида, соответствующего последовательности 593 - 603 белка gr-41 ВИЧ-2. Показано отсутствие рацемизации при конденсации фрагмента с C-концевым аргинином. Отработаны условия получения циклического дисульфида с высоким выходом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались аминокислоты и их производные фирм Reanal (Венгрия), Fluka (Швейцария) или полученные по стандартным методикам: [16]. Индивидуальность полученных соединений проверяли с помощью ТСХ на хроматографических пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системах растворителей: хлороформ-метанол-32% уксусная кислота, 12 : 5 : 4 (А); n-бутанол-уксусная кислота-вода, 3 : 1 : 1 (Б); n-бутанол-уксусная кислота-пиридин-вода, 10.5 : 6 : 1 : 7.5 (В); хлороформ-метанол-уксусная кислота, 9 : 1 : 0.5 (Г). Вещества проявляли на хроматограммах с помощью хлорбензидина или нингидрина. Температуры плавления (нескорректированные) определяли на приборе Voetius (ГДР). Углы удельного оптического вращения измеряли на приборе Perkin-Elmer 241 МС. Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных в 6 н. HCl с 2% тиогликолевой кислоты при 110°C в течение 24 ч, проводили на аминокислотном анализаторе Biotronik LC 5001 (ФРГ). ВЭЖХ осуществляли на колонке

(4.6 × 250 мм) Ultrasphere ODS, 5 мкм (Merck) в градиенте ацетонитрила от 14 до 56% в 0.05 М KH_2PO_4 , pH 3, за 30 мин при скорости потока 1 мл/мин. Пептиды детектировали при 220 нм.

DMF перегоняли над нингидрином и окисью бария, пиридин – над щелочью. Для экстракции из водных растворов, кристаллизации и хроматографии на силикагеле использовали растворители марок ч. и х. ч. Для ВЭЖХ применяли ацетонитрил фирмы Technopharm (Россия).

Woc-Val-Cys(Acm)-NH₂Et (I). 10.44 г (25.19 ммоль) Woc-Cys(Acm)-ONp растворяли в 70 мл DMF, добавляли 60 мл 5% раствора NH_2Et в хлороформе. Реакционную смесь перемешивали 15 мин при 20°C, упаривали, оставшееся масло обрабатывали 60 мл TFA 1 ч при 20°C, упаривали. Масло растворяли в 50 мл хлороформа и наносили на колонку (40 × 240 мм) с силикагелем Si 60, 90 - 130 мкм (Serva, ФРГ) в хлороформе. Элюцию проводили хлороформом, затем ступенчато смесями хлороформ-этанол в соотношениях 9 : 1 и 8 : 2 (по 500 мл каждой). Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали. Масло растворяли в 100 мл DMF, добавляли 7.96 г (25.32 ммоль) Woc-Val-OSu. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, упаривали, остаток растворяли в 400 мл смеси *n*-бутанол-этилацетат (1 : 1), промывали последовательно насыщенным раствором NaHCO_3 (2 × 200 мл), водой, 2% раствором H_2SO_4 (2 × 200 мл), водой до нейтральной реакции. Органический слой упаривали, остаток кристаллизовали из изопропилового спирта. Осадок отфильтровывали, промывали гексаном, сушили на воздухе при 20°C. Выход 9.22 г (87%), R_f 0.87 (А), 0.77 (Б), 0.56 (Г), $[\alpha]_D^{20}$ -23.75° (с 4.0, DMF), т. пл. 138 - 140°C.

Woc-Gln-Val-Cys(Acm)-NH₂Et (II). 9.22 г (21.98 ммоль) соединения (I) обрабатывали 60 мл TFA 1 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали, обрабатывали эфиром (2 × 100 мл), растворяли в 200 мл воды и обрабатывали дауэксом 2×8 в OH⁻-форме до pH 8. Смолу отфильтровывали, промывали на фильтре водой, объединенные фильтраты упаривали досуха. Масло растворяли в 100 мл DMF, добавляли 8.45 г (23.20 ммоль) Woc-Gln-ONp. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, упаривали наполовину, добавляли 100 мл этилацетата, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали многократно этилацетатом, гексаном, сушили на воздухе при 20°C. Выход 8.33 г (69%), R_f 0.78 (А), 0.68 (Б), 0.77 (Г), $[\alpha]_D^{20}$ -27.40° (с 3.4, DMF), т. пл. 218 - 220°C.

Z-Phe-Arg-OH (III). 13.87 г (32.99 ммоль) Z-Phe-ONp растворяли в 100 мл DMF, добавляли 4.68 г (26.86 ммоль) аргинина. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, упаривали досуха, растворяли в 60 мл хлороформа, наносили на ко-

лонку (40 × 240 мм), заполненную суспензией силикагеля Si 60, 90 - 130 мкм в хлороформе. Элюцию проводили хлороформом, затем ступенчато смесями хлороформ-этанол в соотношениях 9 : 1, 8 : 2, 6 : 4, 2 : 8 (по 500 мл каждой).

Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, упаривали досуха, масло растирали с эфиром. Образовавшееся твердое вещество отфильтровывали, промывали эфиром, сушили на воздухе при 20°C. Выход дипептида (III) 11.13 г (91%). R_f 0.77 (А), 0.65 (Б), 0.63 (В), $[\alpha]_D^{20}$ -15.20° (с 1.0, DMF), т. пл. 131 - 133°C.

Z-Ala-Phe-Arg-OH (IV). 11.13 г (24.43 ммоль) соединения (III) растворяли в 100 мл этанола, гидрировали над 5% Pd/C до исчезновения исходного (III) по ТСХ. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха, полученное масло растворяли в 100 мл DMF, добавляли 8.41 г (24.43 ммоль) Z-Ala-ONp. Обработку реакционной массы проводили так же, как при получении соединения (III). Выход 10.61 г (82%). R_f 0.67 (А), 0.39 (Б), 0.62 (В), $[\alpha]_D^{20}$ -7.44° (с 3.4, DMF), т. пл. 143 - 145°C.

Woc-Cys(Acm)-Ala-Phe-Arg-OH (V) получали так же, как соединение (IV), из 10.61 г (20.14 ммоль) соединения (IV) и 8.30 г (20.14 ммоль) Woc-Cys(Acm)-ONp. Выход 11.94 г (84%). R_f 0.64 (А), 0.32 (Б), 0.62 (В), $[\alpha]_D^{20}$ -1.25° (с 4.0, DMF), т. пл. 164 - 166°C.

Z-Trp-Gly-OH · DCHA (VIa). 6.81 г (15.60 ммоль) Z-Trp-ONSu растворяли в 75 мл DMF, при перемешивании добавляли раствор 1.23 г (16.38 ммоль) глицина в 16.38 мл (16.38 ммоль) 1 н. NaOH. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C. Растворитель упаривали в вакууме, к остатку добавляли 150 мл этилацетата, промывали 2% H_2SO_4 (2 × 50 мл) и водой до нейтральной реакции, упаривали досуха. Остаток растворяли в 70 мл изопропилового спирта, добавляли 3.12 мл (16.38 ммоль) DCHA. Осадок отфильтровывали, промывали изопропиловым спиртом, сушили на воздухе при 20°C. Выход 7.78 г (86%). R_f 0.27 (Г), 0.81 (Б), 0.67 (В), $[\alpha]_D^{20}$ -13.72° (с 3.1, DMF), т. пл. 106 - 109°C.

Z-Ser(Bu^t)-Trp-Gly-OH · DCHA (VIIa). 7.78 г (13.49 ммоль) соединения (VIa) суспендировали в 300 мл этилацетата, промывали 2% H_2SO_4 (3 × 100 мл), водой до нейтральной реакции, упаривали досуха. Полученный Z-Trp-Gly-OH (VI) растворяли в 60 мл этанола, добавляли эквивалентное количество 1 н. NaOH и гидрировали над 5% Pd/C до исчезновения исходного соединения (VI) по ТСХ. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в 50 мл DMF, добавляли 6.70 г (14.16 ммоль) Z-Ser(Bu^t)-ONB. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, упаривали, растворяли в 200 мл этилацетата, далее

обрабатывали и получали DCNA-соль аналогично соединению (VIa). Выход 9.14 г (94%). R_f 0.79 (A), 0.84 (B), 0.78 (B), $[\alpha]_D^{20} +1.10^\circ$ (с 3.6, DMF), т. пл. 108 - 110°C.

Woc-Asn-Ser(Bu^t)-Trp-Gly-OH (VIII) получали аналогично соединению (VII) из 9.14 г (12.69 ммоль) соединения (VIIa) и 4.89 г (13.84 ммоль) Woc-Asp-ONp. Вместо 1 н. NaOH использовали 7.23 мл (12.69 ммоль) 35% раствора гидроксида бензилтриметиламмония в метаноле. Выход продукта 5.68 г (72%). R_f 0.73 (A), 0.63 (B), 0.70 (B), $[\alpha]_D^{20} -2.18^\circ$ (с 4.1, DMF), т. пл. 130 - 132°C.

Woc-Cys(Acm)-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys(Acm)-NH₂Et (IX). 8.33 г (15.20 ммоль) соединения (II) обрабатывали 60 мл TFA 1 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали, масло растирали с эфиром, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакууме над NaOH. Полученный продукт растворяли в 200 мл смеси вода-изопропанол (1 : 1) и обрабатывали дауэксом 2 × 8 в OH⁻ форме до pH 8. Смолу отфильтровывали, промывали на фильтре водой, объединенные фильтраты упаривали досуха. Масло растворяли в 100 мл DMF, добавляли 10.67 г (15.20 ммоль) соединения (V), 2.43 г (15.20 ммоль) бромгидрата пиридина в 100 мл DMF, 2.40 г (17.80 ммоль) НОВТ. Реакционную смесь охлаждали до -30°C, добавляли при перемешивании 3.36 г (16.32 ммоль) DCC, перемешивали 1 ч при -30°C, 12 ч при 20°C. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом, выпавший осадок отфильтровывали, промывали многократно на фильтре этилацетатом, гексаном, сушили на воздухе при 20°C и дважды экстрагировали кипящим метанолом для удаления дициклогексилмочевины. Выход 14.98 г (90.0%), R_f 0.75 (A), 0.63 (B).

TFA · H-Cys(Acm)-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys(Acm)-NH₂Et (IXa). 14.98 г (13.70 ммоль) соединения (IX) обрабатывали 60 мл TFA 1 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали, масло растирали с эфиром, осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакууме над NaOH. Выход 13.22 г (87.0%). R_f 0.21 (A), 0.35 (B), $[\alpha]_D^{20} -32.56^\circ$ (с 1.3, 2% HCOOH).

H-Asn-Ser(Bu^t)-Trp-Gly-Cys(Acm)-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys(Acm)-NH₂Et (X). 3.09 г (2.78 ммоль) соединения (IXa) растворяли в 200 мл смеси вода-изопропанол (1 : 1) и добавляли дауэкс 2 × 8 в OH⁻ форме до pH 8. Смолу отфильтровывали, промывали на фильтре водой, объединенные фильтраты упаривали досуха. Полученный аминокислотный компонент конденсировали с 2.07 г (3.34 ммоль) тетрапептида (VIII) по методике, приведенной для (IX). Выделенный Woc-ундекапептид (Xa) обрабатывали 20 мл TFA по методике, описанной для (IXa). Продукт подвергали очистке на колон-

ке (26 × 750 мм) с SP-сефадексом С-25, уравновешенным 0.05 М пиридин-ацетатным буфером. Элюцию проводили градиентом ионной силы пиридинацетата от 0.05 до 1 М раствора со скоростью 25 мл/ч. Детекцию осуществляли при 280 нм. Фракции, содержащие основной продукт, объединяли, упаривали, растворяли в воде и лиофилизировали. Выход 2.20 г (78.6%). R_f 0.38 (A), 0.11 (B), 0.47 (B), $[\alpha]_D^{20} -37.29^\circ$ (с 1.2, 2% HCOOH).

Woc-Cys(Acm)-Ala-Phe-DArg-OH (XI) получали аналогично соединению (V), используя соответствующие производные D-Arg (см. схему синтеза на рис. 1 и "Экспериментальную часть"). Выход 1.40 г (42%). R_f 0.52 (A), 0.49 (B), $[\alpha]_D^{20} -25.68^\circ$ (с 2.9, DMF), т. пл. 155 - 162°C.

H-Cys(Acm)-Ala-Phe-DArg-Gln-Val-Cys(Acm)-NH₂Et (XII) получали аналогично соединению (IX), исходя из 0.27 г (0.49 ммоль) соединения (II) и 0.32 г (0.46 ммоль) соединения (XI). Выход 0.29 г (56%). R_f 0.62 (A), 0.32 (B), $[\alpha]_D^{20} -1.98^\circ$ (с 2.6, 2% HCOOH).

H-Asn-Ser-Trp-Gly-Cys-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys-NH₂Et (XIII). Замыкание дисульфидных связей проводилось несколькими реагентами.

а) К раствору 0.72 г (0.50 ммоль) соединения (X) в 50 мл 30% CH₃COOH прибавляли раствор 0.65 г (1.02 ммоль) Hg(OAc)₂ в 10 мл 30% CH₃COOH. Перемешивали реакционную смесь 1.5 ч при 20°C, пропускали H₂S в течение 20 мин. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре дважды 5% CH₃COOH и дважды водой. Фильтрат дегазировали, разбавляли водой до 0.85 л, прибавляли раствор аммиака до pH 6.8. При перемешивании к реакционной массе добавляли 3 мл 3% раствора H₂O₂. Полноту образования дисульфидной связи контролировали при помощи реактива Эллмана. Реакционную смесь (рис. 3а) упаривали до объема 200 мл, добавив предварительно 3 мл CH₃COOH, обессоливали с помощью ВЭЖХ на колонке (25 × 250 мм) Диасорб-130, С-16-Т в градиенте буфера Б в буфере А (буфер А - 0.1% водная TFA; буфер Б - 70% ацетонитрила в 0.1% водной TFA) от 20 до 60% за 40 мин. Скорость элюции 12 мл/мин. Фракции, соответствующие главному пику, объединяли, ацетонитрил упаривали, полученный раствор разбавляли водой и лиофилизировали. Выход соединения (XIII) 0.56 г (85%). R_f 0.41 (A), 0.20 (B), 0.53 (B), $[\alpha]_D^{20} -4.63^\circ$ (с 2.2, 2% HCOOH), R_f 15.48 (см. рис. 3д). Аминокислотный состав: Gly 1.00 (1), Asp 1.02 (1), Ser 0.91 (1), Glu 1.08 (1), Ala 1.04 (1), Val 0.99 (1), Phe 0.97 (1), Arg 1.08 (1). Содержание пептидного материала (по данным количественного аминокислотного

анализа) 89.2%. ESI-MS: 1295.9 $[M + H]^+$, 648.5 $[M + 2H]^{2+}$ (вычислено M 1295).

б) К раствору 0.05 г (0.03 ммоль) соединения (X) в 2 мл TFA добавляли при перемешивании 0.15 г (0.68 ммоль) трифторацетата серебра (20 экв.) и 0.04 мл (0.34 ммоль) анизол (10 экв.); реакционную смесь перемешивали 2 ч при 20°C, упаривали, оставшееся масло растирали с эфиром, растворитель декантировали. Остаток растворяли в 5 мл 50% CH_3COOH , добавляли 0.16 г (1.70 ммоль) этандитиола (50 экв.), смесь перемешивали 2 ч при 20°C. Образовавшийся осадок солей серебра отфильтровывали, промывали на фильтре 50% CH_3COOH (рис. 3б). Фильтрат хроматографировали на колонке (25 × 290 мм) с сефадексом G-15 10% CH_3COOH . Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, разбавляли водой до объема 50 мл, титровали концентрированным раствором аммиака до pH 7 и затем добавляли 0.5 мл 3% раствора перекиси водорода. Полноту образования дисульфидной связи контролировали при помощи реактива Элмана. Обессоливание проводили методом ВЭЖХ в условиях метода "а". Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, упаривали, растворяли в 10 мл воды, лиофилизировали. Выход соединения (XIII) 0.03 г (60%). R_f 0.41 (A), 0.20 (B), 0.53 (B), $[\alpha]_D^{20}$ -4.63° (с 2.2, 2% HCOOH), R_f 15.47.

в) К раствору 0.20 г (0.14 ммоль) соединения (X) в 50 мл 50% CH_3COOH добавляли 180 мл раствора иода в 80% CH_3COOH (концентрация 2.25 мг в 1 мл). Через 2 ч избыток иода удаляли 10% раствором тиосульфата натрия, упаривали реакционную смесь до 30 мл. Целевой продукт очищали ВЭЖХ в тех же условиях, что и в опыте "а". Фракции, соответствующие целевому и побочным продуктам, упаривали и лиофилизировали. Выход соединения (XIII) 0.05 г (28%). R_f 0.41 (A), 0.20 (B), 0.53 (B), $[\alpha]_D^{20}$ -4.63° (с 2.2, 2% HCOOH), R_f 15.47. Побочные продукты: 1) 0.04 г (30%)* вещества, соответствующего пику с R_f 11.10 (см. рис. 3в), аминокислотный анализ: Gly 1.00 (1), Glu 1.08 (1), Ala 1.04 (1), Val 1.20 (1), Phe 1.04 (1), Arg 0.89 (1); ESI-MS: 908.9 $[M + H]^+$, 454.8 $[M + 2H]^{2+}$ (вычислено: M 907.6); 2) 0.01 г (6%)* вещества, соответствующего пику с R_f 16.70 (см. рис. 3в), аминокислотный анализ: Asp 1.00 (1), Ser 0.60 (1), Glu 1.05 (1), Gly 0.94 (1), Ala 1.00 (1), Val 1.40 (1), Phe 1.01 (1), Trp 0.46 (1), Arg 0.67 (1); ESI-MS: 1407.7 $[M + H]^+$, 704 $[M + 2H]^{2+}$, 715.3 $[(M + 2H)^{2+} + Na]$ (вычислено: M 1407). Вычислено для

$C_{56}H_{82}N_{18}O_{17}S_4 \cdot 2CF_3COOH$ (M 1407 + 2 × 114): S 7.83%. Найдено: S 7.95%.

г) К раствору 0.13 г (0.09 ммоль) соединения (X) в 40 мл 50% CH_3COOH добавляли 133 мл раствора иода в 80% CH_3COOH (концентрация 2.25 мг в 1 мл). Через 2 ч избыток иода удаляли 10% раствором аскорбиновой кислоты, упаривали реакционную смесь до 30 мл, очищали методом ВЭЖХ так же, как в опыте "а". Фракции, соответствующие целевому и побочному продуктам, упаривали и лиофилизировали. Выход соединения (XIII) 0.03 г (26%) R_f 0.41 (A), 0.20 (B), 0.53 (B), $[\alpha]_D^{20}$ -4.63° (с 2.2, 2% HCOOH), R_f 15.47. Выход побочного продукта (1) (см. методику "в") 0.02 г (28%), R_f 11.10.

д) Раствор 0.025 г (0.017 ммоль) соединения (X) в 122 мл смеси метанол-вода (1 : 6) продували N_2 , прибавляли по каплям при перемешивании раствор 4.55 мг (0.018 ммоль) иода в 17.5 мл метанола в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C, добавляли 1 М раствор $Na_2S_2O_3$ до полного обесцвечивания раствора (рис. 3г). Метанол упаривали, остаток обессоливали с помощью ВЭЖХ так же, как в опыте "а". Выход соединения (XIII) 0.015 г (66%). R_f 0.41 (A), 0.20 (B), 0.53 (B), $[\alpha]_D^{20}$ -4.63° (с 2.2, 2% HCOOH), R_f 15.47.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Narvanen A., Korkkolainen M., Suni J. // J. Med. Virol. 1988. V. 26. P. 111 - 118.
2. Petrov R.V., Khaitov R.M., Sidorovich I.G., Pavlikov S.P., Nikolaeva I.A., Ivachenko M.E., Andreev S.M., Sklyrov L.Yu. // Biomed. Sci. 1990. V. 1. P. 239 - 244.
3. Расули А.М., Клепиков Н.Н., Андреев С.М., Сидорова М.В., Вафина М.Г., Сенюта М.Б., Павлиш О.А., Сырцев А.В., Гурцевич В.Е. // Молекулярная биология. 1993. Т. 27. С. 880 - 887.
4. Kotwal G.J., Baroudy B.M., Kuramoto I.K., McDonald F.F., Schiff G.M., Holland P.V., Zeldis J.B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 4486 - 4489.
5. Gnann J., McCormick J., Mitchell S., Nelson J., Oldstone M. // Science. 1987. V. 237. P. 1346 - 1349.
6. Ovchinnikov M.V., Bepalova J.D., Sepetov N.F. // Abstracts 8th Symposium of Chemistry of Peptides and Proteins FRG - USSR. Aachen, 1991. P. 6.
7. Овчинников М.В., Пекелис Б.Л., Скуя А.Ж., Туттов М.И. Способ очистки N-защищенных пептидов, содержащих C-терминальный незащищенный аргинин. А. с. 1031 134 СССР. 1983.
8. Benz H. // Synthesis. 1993. P. 337 - 358.
9. Kaufmann K.-D., Dölling R. // J. Prakt. Chem. 1978. B. 320. S. 814 - 824.

* Здесь и далее приведены выходы побочных продуктов, рассчитанные по молекулярным массам, определенным ESI-MS.

10. Rivier J., Kaiser R., Galyean R. // *Biopolymers*. 1978. V. 17. P. 1927 - 1938.
11. Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д., Молокоедов А.С., Титов М.И., Ревенко И.В., Виноградов В.А., Коробов Н.В., Жуковский С.В. // *Биоорганическая химия*. 1988. Т. 14. С. 777 - 782.
12. Stewart J.M., Young J.D. *Solid Phase Peptide Synthesis*. 2 Ed. N.Y.: Pierce Chem. Company, 1984.
13. Fujii N., Otaka A., Watanabe T., Okamachi A., Tamamura H., Yajima H., Inagaki Y., Nomizu M., Asano K. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989. P. 283 - 284.
14. *Практическая химия белка* / Ред. Дарбре А. Пер. с англ. М.: Мир, 1989.
15. Реми Г. *Курс неорганической химии*. Т. 1. М.: Иностран. лит-ра, 1963.
16. Гершкович А.А., Кибирев В.К. *Химический синтез пептидов*. Киев: Наук. думка, 1992.

Synthesis of Cyclic Undecapeptide Ethylamide Corresponding to the 593 - 603 Sequence of Transmembrane Glycoprotein gp41 of the Human Immunodeficiency Virus Type Two

M. V. Sidorova*, E. V. Kudryavtseva, A. S. Molokoedov,
M. V. Ovchinnikov, and Zh. D. Bespalova

*Cardiological Scientific Center, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. 3-ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia*

Abstract – Ethylamide of cyclic disulfide of peptide HIV-2 antigen corresponding to 593 - 603 sequence of gp41 protein was synthesized by conventional methods of peptide chemistry in solution. The absence of racemization during fragment condensation was shown. Different methods of disulfide bond formation were compared.

Key words: antigen determinant of HIV-2, fragment condensation, racemization, disulfide bond, side reactions.

* To whom correspondence should be addressed.