



УДК 547.466.96;602.017.1-018+616-097

ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА ДЛЯ ЗАМЫКАНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В СИНТЕЗЕ ПЕПТИДОВ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИММУНОДОМИНАНТНОГО ЭПИТОПА ГЛИКОПРОТЕИНА gp41 ВИЧ

© 1996 г. М. В. Сидорова[#], Е. В. Кудрявцева, М. Л. Антопольский, М. Е. Палькеева, М. В. Овчинников, Ж. Д. Беспалова

Кардиологический научный центр РАМН, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15-а

Поступила в редакцию 28.09.95 г.

Разработан простой и быстрый способ замыкания внутримолекулярных дисульфидных связей в триптофансодержащих пептидах с помощью перекиси водорода, обеспечивающий высокий выход целевых дисульфидов. Осуществлен твердофазный синтез пептидного фрагмента (601–617) трансмембранного гликопротеина gp41 ВИЧ-1 с использованием Fmoc-техники. Показано, что включение в пептидную цепь Fmoc-Asn-OH с помощью ДСС/НОВТ сопровождается побочной реакцией дегидратации амидной функции аспарагина с образованием 22% побочного продукта, содержащего β-цианоаланин. Этой побочной реакции не наблюдалось при использовании Fmoc-Asn-ONp/НОВТ.

Ключевые слова: антигенные детерминанты белков ВИЧ, дисульфидная связь, перекись водорода, твердофазный синтез, β-цианоаланин.

При синтезе в препаративном масштабе пептидных антигенов, входящих в состав отечественных диагностических систем для выявления СПИД, мы столкнулись с необходимостью быстрого и полного замыкания дисульфидных связей, обеспечивающего простое (желательно одностадийное) выделение целевых продуктов. Известно, что замыкание внутримолекулярных дисульфидных связей часто сопровождается такими побочными реакциями, как димеризация и полимеризация [1], модификация остатков тирозина и триптофана [2, 3], деструкция триптофана [4].

В ряду достаточно большого набора существующих приемов циклизации наиболее распространено окисление пептидных тиолов, полученных после деблокирования остатков цистеина, кислородом воздуха или феррицианидом калия при pH 7–8, а также прямая конверсия Cys-защищенных пептидов в соответствующие дисульфиды под действием иода.

Использованы сокращения, рекомендованные комиссией IUPAC-IUB (Eur. J. Biochem. 1984. V. 183. № 1. P. 9–37), а также: Acм – ацетамидометил, EDT – 1,2-этандитиол, ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry) – масс-спектрометрия с электроспрей-ионизацией, Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил, НОВТ – 1-гидроксibenзотриазол, NMP – N-метилпирролидон, ONp – n-нитрофенилокси.

[#] Автор для переписки.

Окисление кислородом воздуха требует достаточно длительного времени (обычно нескольких суток), а применение феррицианида калия или иода, как правило, сопряжено с многостадийной очисткой конечного продукта.

В литературе имеются отдельные упоминания о применении перекиси водорода для создания дисульфидной связи, например, при синтезе окситоцина и вазопрессина [5]. Однако этот метод не является традиционным и его возможности изучены недостаточно.

Предварительная оценка эффективности различных окислителей для замыкания S–S-мостика в пептидном фрагменте 593–603 гликопротеина gp41 ВИЧ-2 [4] показала преимущества применения перекиси водорода для этих целей.

Настоящая работа – продолжение экспериментов по использованию этого реагента в синтезе цистеинсодержащих пептидов на примере пептидных фрагментов гликопротеина gp41 из различных штаммов ВИЧ (табл. 1). Особенностью этих пептидов является наличие остатков триптофана, наиболее подверженного побочным реакциям в процессе циклизации.

Для блокирования сульфгидрильной функции остатков цистеина нами применялась ацетамидометильная группа, хорошо зарекомендовавшая себя в синтезе самых различных пептидов. Для

Таблица 1. Выходы циклических пептидов при замыкании дисульфидной связи иодом и перекисью водорода

Пептид	Участок gp41 (штамм)	Аминокислотная последовательность	Выход*, %	
			I ₂	H ₂ O ₂ **
P1	598–609 (ВИЧ-1, Z3)	H-LGLWGCSGKLIC-NHEt	51	75–85
P2	598–609 (ВИЧ-1, ELI)	H-LGIWGCSGKHNIC-NHEt	56	85–90
P3	593–603 (ВИЧ-2, ROD)	H-NSWGCAFRQVC-NHEt	66	80–87
P4	601–617 (ВИЧ-1, BRU)	H-WGCSGKLICTTAVPWNA-OH	25	85–90

* Выходы приведены в расчете на Cys(Asm)-пептиды.

** Приведен разброс выходов продуктов в экспериментах с нагрузками пептидов от 0.1 до 1.0 ммоль.

блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот использовали кислотолабильные защиты *трет*-бутильного типа.

Пептиды P1–P3 были получены фрагментной конденсацией в растворе в соответствии с методиками, описанными нами в работах [4, 6, 7]. После отщепления *трет*-бутильных защитных групп Cys(Asm)-производные пептидов P1–P3 очищали с помощью препаративной ВЭЖХ на обращенной фазе. Их индивидуальность составляла 90–95% (по данным ВЭЖХ), а константы соответствовали описанным ранее [4, 6, 7].

Пептид P4 был синтезирован твердофазным методом на сополимере стирола с 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой (смола Ванга) с использованием DCC/НОВТ-метода. Для блокирования α -амино-функции применялась Fmoc-группа, в ходе синтеза отщеплявшаяся действием 20% пиперидина в NMP. Для создания амидной связи в соответствии со стандартной программой автоматического синтезатора Applied Biosystems 431 для Fmoc-техники Fmoc-аминокислоты (4-кратные избытки) предварительно активировали в присутствии 4 экв. DCC/НОВТ в NMP. По окончании синтеза пептид P4 отщепляли от носителя с помощью TFA.

В ходе наших экспериментов выяснилось, что качество конечного продукта твердофазного синтеза – [(Cys(Asm))₂]P4 – непосредственно зависит от способа введения в пептидную цепь остатка аспарагина. При присоединении Fmoc-Asp-OH с помощью DCC/НОВТ-метода (методика А) сырой продукт, судя по данным ВЭЖХ (рис. 1а), содержал целевой пептид (61%) и побочный продукт (22%). Эти вещества были разделены с помощью хроматографии на Toyopearl HW-40 в 2% водной муравьиной кислоте. Интересно, что профиль элюции пептида при хроматографировании на HW-40 в препаративном масштабе (рис. 2) прак-

тически полностью воспроизводил картину аналитической ВЭЖХ этого продукта.

Основной и побочный продукты твердофазного синтеза были исследованы с помощью количественного аминокислотного анализа и ESI-MS (для проведения аналитических исследований побочный продукт был дополнительно очищен ВЭЖХ). При этом было установлено, что основной продукт по аминокислотному составу и молекулярной массе соответствует целевому пептиду P4. Побочный продукт имел тот же аминокислотный состав, однако его молекулярная масса была на 18 Да меньше. Мы предположили, что это вещество образуется в результате дегидратации незащищенной амидной функции аспарагина в присутствии DCC и содержит в пептидной цепи остаток β -цианоаланина вместо остатка аспарагина. Наше предположение согласуется с данными работы [8] по изучению дегидратации Fmoc-аспарагина в присутствии различных конденсирующих агентов. Правильность этого предположения подтверждается также тем, что замена карбодимидного способа конденсации Fmoc-Asp-OH (методика А) на метод активированных эфиров (Fmoc-Asp-ONp в присутствии НОВТ) при твердофазном синтезе пептида P4 (методика Б) приводит к существенному повышению содержания целевого вещества (до 81%) в сыром продукте (рис. 1б).

Далее мы отработывали условия отщепления Asm-защитных групп цистеиновых остатков (получение соответствующих SH-пептидов) и последующего замыкания в этих соединениях внутримолекулярных S–S-мостиков (рис. 3).

Для контроля происходящих превращений параллельно использовали ВЭЖХ и реакцию на свободную SH-группу с реактивом Элмана [9]. Для каждого из изучаемых пептидов нами были подобраны условия аналитической ВЭЖХ, в которых Asm-, SH- и S–S-формы хорошо разрешались (см., например, рис. 4).

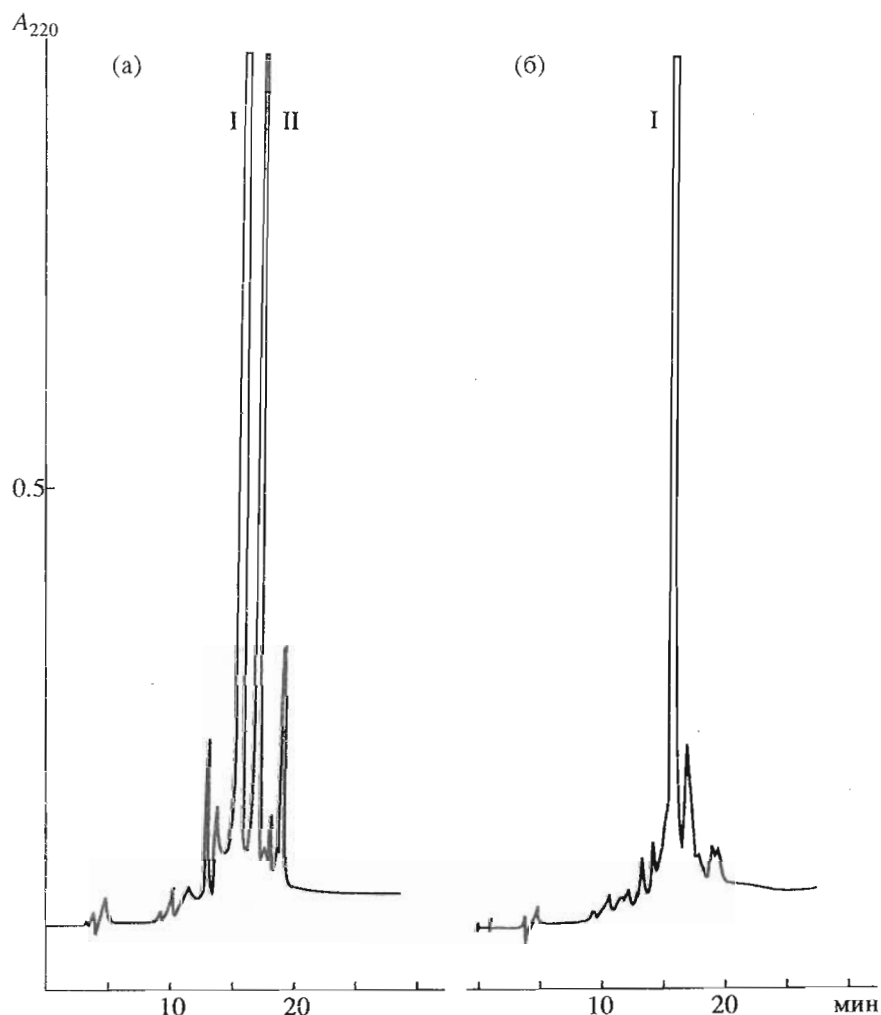


Рис. 1. Аналитическая ВЭЖХ неочищенного пептида [(Cys(Acm))₂]P₄. Элюция градиентом от 20 до 80% буфера Б в буфере А за 30 мин (см. “Экспер. часть”). а – синтез по методике А (Fmoc-Asn-OH + DCC + НОВТ). Содержание целевого продукта (пик I) 60.9%, содержание побочного продукта дегидратации аспарагина (пик II) 21.9%. б – синтез по методике Б (Fmoc-Asn-ONp + НОВТ), содержание целевого продукта (пик I) 81.8%.

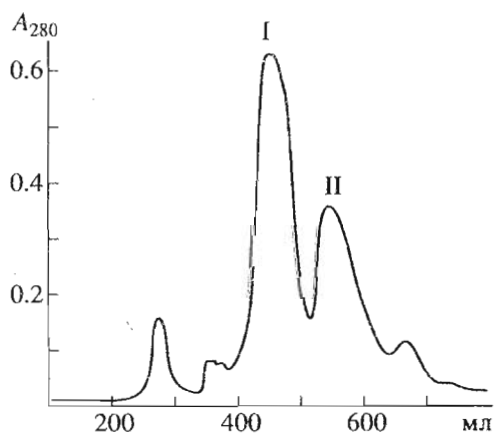


Рис. 2. Профиль элюции пептида [(Cys(Acm))₂]P₄, полученного по методике А, при хроматографии на Тоуорегl HW-40 в 2% муравьиной кислоте. Пик I – целевой продукт, пик II – побочный продукт дегидратации аспарагина.

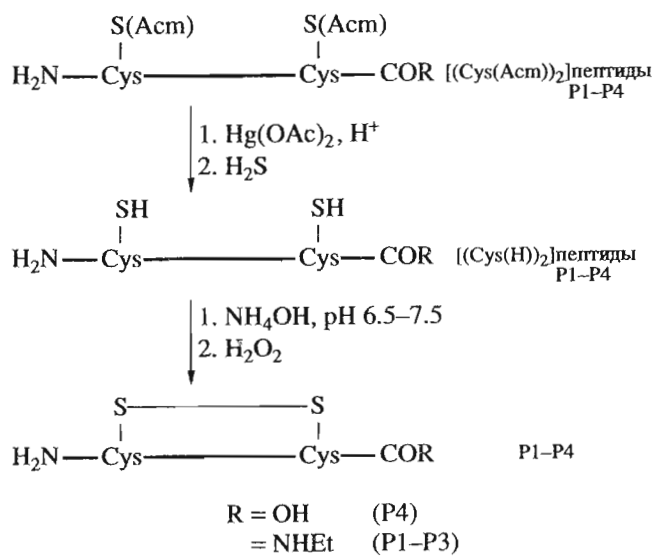


Рис. 3. Схема получения циклических пептидов P1–P4.

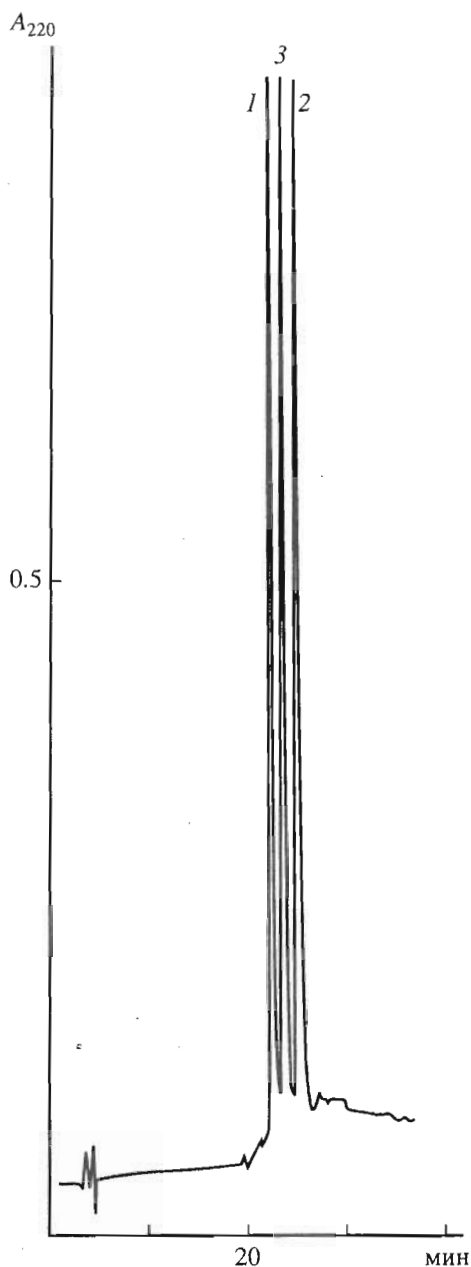


Рис. 4. Аналитическая ВЭЖХ смеси образцов различных форм пептида P3. 1 – $[(\text{Cys}(\text{Asn}))_2]\text{P3}$; 2 – $[(\text{Cys}(\text{H}))_2]\text{P3}$; 3 – P3. Элюция градиентом от 20 до 60% буфера Б в буфере А за 40 мин.

Для отщепления Асн-защитных групп во всех случаях мы применяли ацетат ртути (2 экв. на каждую SH-функцию) в кислой водной среде, а для последующего удаления ионов ртути – сероводород. Выбранная комбинация реагентов обеспечивала количественное деблокирование SH-групп в течение 1–1.5 ч и быстрое, практически количественное удаление ионов металла, так как сульфид ртути имеет очень низкую растворимость и легко осаждается из кислых растворов.

Отщепление Асн-групп солями серебра обычно требует применения больших избытков деблокирующего реагента [10]; прямое окисление Cys-замещенных пептидов трифторацетатом таллия (III) сопровождается побочными реакциями по триптофану [11]. Соли этих металлов менее доступны; кроме того, для последующего удаления ионов серебра и таллия требуются 10–50-кратные избытки органических тиолов, которые в свою очередь необходимо отделять от пептида хроматографически.

Деблокирование сульфгидрильных групп ацетатом ртути в пептидах P2–P4 осуществляли в 30–50% водной уксусной кислоте. В случае пептида P1 уксусная кислота была заменена на муравьиную, так как в уксусной кислоте $[(\text{Cys}(\text{H}))_2]\text{P1}$ осаждался из раствора одновременно с сульфидом ртути при разрушении соответствующего меркаптида ртути действием сероводорода.

Следует подчеркнуть необходимость тщательного удаления избытка сероводорода из растворов SH-производных пептидов после отделения осажденного сульфида ртути, так как, по нашим наблюдениям, на следующей стадии (рис. 3) в присутствии окислителя остаточный сероводород или образующиеся из него гидросульфид аммония (при подщелачивании), а также коллоидная сера могут приводить к образованию побочных продуктов (их структура не определялась). В наших опытах остаточный сероводород из кислых растворов SH-производных пептидов P1–P4 отдували азотом или удаляли в вакууме (упариванием соответствующей реакционной смеси).

Замыкание дисульфидного мостика проводили в водных растворах с концентрацией пептидов 0.8–1.0 мг/мл при pH 6.5–7.5 в присутствии 10–20-кратных мольных избытков перекиси водорода. Во всех изученных нами случаях окисление происходило быстро (в течение 15–30 мин) и однозначно. Выход целевых продуктов окисления был высоким – 75–90%. Нами не было отмечено существенного образования каких-либо побочных продуктов. По окончании циклизации реакционные смеси подкисляли уксусной кислотой, концентрировали и обессоливали с помощью ВЭЖХ или гель-фильтрации на сефадексе G-25 (в случае пептида P1, который достаточно сильно сорбировался на обращенной фазе). Все пептиды были получены с высокими выходами – 80–90%. Следует также отметить хорошую воспроизводимость результатов окисления в опытах с различными загрузками (от 0.10 до 1.00–1.50 г) для каждого из пептидов. Сопоставление выходов циклических пептидов P1–P3 при замыкании дисульфидного мостика иодом в уксусной кислоте или метаноле по известным методикам [9] и перекисью водорода (в расчете на соответствующие

Таблица 2. Характеристики циклических пептидов

Аминокислотная последовательность	Молекулярная масса, M_r	ESI-MS $[M + H]^+$	R_t , мин (ВЭЖХ)	R_f (система)	Аминокислотный анализ*
H-LGLWGCSGKLIC-NHEt (P1) $C_{58}H_{95}N_{15}O_{13}S_2$	1274.6	1275.1	20.79	0.55 (A) 0.30 (Б) 0.75 (B)	Ser 0.88(1); Gly 3.00(3); Ile 0.90(1); Leu 3.12(3); Lys 1.02(1)
H-LGIWGCSGKNIC-NHEt (P2) $C_{58}H_{81}N_{17}O_{13}S_2$	1298.6	1298.7	16.28	0.34 (A) 0.06 (Б) 0.56 (B)	Ser 0.87(1); Gly 3.00(3); Ile 1.86(2); Leu 1.01(1); His 1.05(1); Lys 1.02(1)
H-NSWGCAFRQVC-NHEt (P3) $C_{56}H_{82}N_{18}O_{14}S_2$	1295.5	1295.9	15.48	0.41 (A) 0.20 (Б) 0.53 (B)	Asx 1.02(1); Ser 0.91(1); Glx 1.08(1); Gly 1.00(1); Ala 1.04(1); Val 0.99(1); Phe 0.97(1); Arg 1.08(1)
H-WGCSGKLICTTAVPWNA-OH (P4) $C_{81}H_{121}N_{21}O_{22}S_2$	1805.1	1806.4	17.98	0.41 (A) 0.30 (Б) 0.74 (B)	Asx 1.05(1); Thr 1.91(2); Ser 0.88(1); Gly 2.00(2); Ala 2.10(2); Val 1.10(1); Ile 0.85(1); Leu 1.03(1); Lys 1.08(1)

* Содержание Trp и Cys в гидролизатах пептидов не определяли.

Асм-производные) показывает преимущество последнего реагента (табл. 1).

Полученные пептиды P1–P4 были индивидуальны по данным ТСХ и ВЭЖХ, их молекулярные массы и аминокислотный состав соответствовали ожидаемым значениям (табл. 2).

Таким образом, использование перекиси водорода для замыкания дисульфидной связи в триптофансодержащих пептидах обеспечивает простое, быстрое и эффективное получение целевых продуктов в граммовых количествах с хорошей воспроизводимостью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы L-аминокислоты и их производные фирм Fluka и Bachem (Швейцария), фенол (Merck, Германия), EDT, DCC, НОВТ, ацетат ртути, 5,5'-дителиобис(2-нитробензойная кислота) – реагент Элмана и 30% перекись водорода (Fluka, Швейцария). Перед проведением реакций окисления 30% раствор перекиси водорода разбавляли в 10 раз. Для синтеза применяли N-метилпирролидон, дихлорметан, пиперидин, метанол и трифторуксусную кислоту фирмы Applied Biosystems (Германия). Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке (4.6 × 250 мм) Ultrasphere ODS (5 мкм; Beckman, США) на хроматографе Gilson (Франция). В качестве элюентов использо-

вали буферы А (0.05 М KH_2PO_4 , pH 3.0) и Б (70% ацетонитрила + 30% буфера А). Пептиды детектировали при 220 нм. Препаративную ВЭЖХ (где не указано особо) проводили на колонке (25 × 250 мм) Диасорб С16 (5 мкм) на приборе Beckman (США) при длине волны 226 нм. Элюенты: А – 0.1% TFA, Б – 80% ацетонитрила + 20% буфера А. Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил фирмы Techpopharm (РФ). ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–32% $AcOH$, 60 : 45 : 20 (А); n-бутанол– $AcOH$ –вода, 3 : 1 : 1 (Б); n-бутанол–пиридин– $AcOH$ –вода, 21 : 12 : 2 : 15 (В). Для аминокислотного анализа пептиды гидролизовали 24 или 48 ч при 110°C 6 н. HCl, содержащей 2% тиогликолевой кислоты, и определяли аминокислотный состав на автоматическом анализаторе Biotronik 5001 (Германия). Масс-спектры снимали на квадрупольном масс-спектрометре Finnigan MAT TSQ 700 (Германия) с электроспрейным (API) ионным источником (Finnigan MAT).

H-Trp-Gly-Cys(Acm)-Ser-Gly-Lys-Leu-Ile-Cys(Acm)-Thr-Thr-Ala-Val-Pro-Trp-Asn-Ala-OH [(Cys(Acm))₂]P4 синтезировали на автоматическом пептидном синтезаторе Applied Biosystems, модель 431, исходя из 0.35 г (0.25 ммоль) Fmoc-Ala-полимера фирмы Bachem с содержанием стартовой аминокислоты 0.72 ммоль/г по стандартной программе для однократной конденсации

Фмос-аминокислот. Согласно этой программе, синтетический цикл включал 20-минутную активацию 1 ммоль присоединяемой аминокислоты в присутствии эквивалентных количеств DCC и НОВТ в NMP, деблокирование α -аминогрупп 20% раствором пиперидина в NMP в течение 20 мин, конденсацию с 1 ммоль (4-кратным избытком) ацилирующего агента в NMP в течение 70 мин и все необходимые промежуточные промывки пептидилполимера. В методике А для получения дипептидилполимера Фмос-Asp-Ala-Р был использован 1 ммоль Фмос-Asp-OH + DCC/НОВТ; в методике Б на данной стадии применяли 1 ммоль Фмос-Asp-ONp + 1 ммоль НОВТ, а время конденсации увеличивали до 2 ч.

По окончании синтеза Фмос-защиту отщепляли как указано выше, пептидилполимер промывали дихлорметаном и сушили в вакууме. Пептидилполимер (0.80 г) суспендировали в 10 мл смеси TFA-EDT-фенол (9.50 : 0.25 : 0.25) и перемешивали 1.5 ч при 20°C. Смола отфильтровывали, промывали TFA (2 × 1 мл), фильтрат упаривали до объема 5 мл и прибавляли 100 мл сухого эфира. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром и этилацетатом, получили 0.41 г сырого продукта. Полученное вещество растворяли в 5 мл 5% водной муравьиной кислоты и хроматографировали на колонке (26 × 700 мм) с носителем Toyopearl HW-40 (Toyo Soda, Япония), уравновешенной 2% муравьиной кислотой. Пептиды элюировали 2% муравьиной кислотой со скоростью 48 мл/ч, детекцию осуществляли при 280 нм. Фракции, соответствовавшие основному (400–540 мл) и побочному (550–640 мл) продуктам, собирали и лиофилизировали. Выход соединения [(Cys(Asm))₂]P4: по методике А 0.21 г (43.1% в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру); по методике Б 0.36 г (73.9% в расчете на стартовую аминокислоту). Аминокислотный анализ: Asx 1.05(1); Thr 1.91(2); Ser 0.88(1); Gly 2.00(2); Ala 2.15(2); Val 1.20(1); Ile 0.87(1), Leu 1.05(1); Lys 1.12(1); Trp и Cys не определяли. ESI-MS: 1949.1 (соответствует расчетной молекулярной массе целевого продукта). В синтезе А получено 0.036 г побочного продукта. Аминокислотный анализ: Asx 1.04(1); Thr 1.82; Ser 0.87(1); Gly 2.00(2); Ala 2.23(2); Val 1.13(1); Ile 0.91(1); Leu 1.00(1); Lys 1.12(1); Trp и Cys не определяли. ESI-MS: 1931.2 (соответствует молекулярной массе, рассчитанной для пептида, содержащего β -цианоаланин вместо аспарагина).

Синтез Cys(Asm)-производных пептидов P1–P3 описан ранее в работах [4, 6, 7].

H-Leu-Gly-Leu-Trp-Gly-Cys-Ser-Gly-Lys-Leu-Pe-Cys-NHEt · 2AcOH (P1). К раствору 0.51 г (0.36 ммоль) Cys(Asm)-P1 в 30 мл 30% муравьиной кислоты прибавляли 0.46 г (1.44 ммоль) аце-

тата ртути, перемешивали 1 ч, пропускали ток сероводорода 20 мин. Осадок отфильтровывали, промывали 5% муравьиной кислотой, фильтрат упаривали досуха при 35°C. Остаток растворяли в 600 мл воды, добавляли 25% водный аммиак до pH 6.5–7.5, 10 мл 3% перекиси водорода и перемешивали 20 мин, контролируя образование S–S-мостика с помощью реактива Эллмана и ВЭЖХ. Реакционную смесь подкисляли 3 мл AcOH, упаривали до объема 20 мл и остаток хроматографировали на колонке (25 × 700 мм) с сефадексом G-25, элюируя пептид 5% AcOH со скоростью 30 мл/ч. Фракции, соответствовавшие целевому веществу, объединяли и лиофилизировали. Выход P1 0.45 г (89.9%). Характеристики пептида представлены в табл. 2.

Типовая методика замыкания S–S-связей в пептидах P2–P4. К раствору 0.1 ммоль Cys(Asm)-производных пептидов P2–P4 в 10–50 мл AcOH прибавляли раствор 0.4 ммоль Hg(OAc)₂ в 2 мл AcOH, перемешивали 1–1.5 ч при 20°C и пропускали ток сероводорода 20 мин. Осадок отфильтровывали, промывали 5% AcOH (2 × 5 мл) и водой (2 × 5 мл). Фильтрат продували током азота до исчезновения запаха сероводорода (\approx 20 мин), разбавляли водой до концентрации пептида 0.8–1.0 мг/мл, прибавляли 25% раствор аммиака до pH 6.5–7.5 и 3–5 мл 3% раствора перекиси водорода. Смесь интенсивно перемешивали 15–30 мин, контролируя образование S–S-мостика при помощи реактива Эллмана и ВЭЖХ. В реакционную смесь добавляли 1–2 мл AcOH, упаривали до объема 10–20 мл и хроматографировали на колонке (25 × 250 мм) с диасорбом-S16T. Элюцию проводили градиентом от 20 до 60% буфера Б в буфере А за 40 мин со скоростью потока 12 мл/мин (буфер А – 0.1% TFA; Б – 80% CH₃CN в А). Фракции, соответствующие целевому продукту, объединяли, упаривали, остаток растворяли в воде и лиофилизировали. Выходы и характеристики полученных продуктов приведены в табл. 1 и 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bodanszky M., Martinez J. // The Peptides. V. 5 / Eds E. Gross, J. Meienhofer. New York, London: Acad. Press, 1983. P. 111–216.
2. Hiskey R.G. // The Peptides. V. 3 / Eds E. Gross, J. Meienhofer. New York, London: Acad. Press, 1981. P. 137–167.
3. Sieber P., Kamber B., Riniker B., Rittel W. // Helv. Chim. Acta. 1980. V. 63. P. 2358–2363.
4. Сидорова М.В., Кудрявцева Е.В., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 675–683.
5. Пансевич О.С., Чипенс Г.И., Михайлова С.В. Нейрогипофизарные гормоны. Рига: Зинатне, 1986.

6. Виноградов В.А., Покровский В.В., Тищенко В.А., Титов М.И., Беспалова Ж.Д., Сакс Т.Р., Овчинников М.В., Семенов А.Н., Пекелис Б.Л., Молокоедов А.С., Суворова З.К., Носков Ф.С., Полосатов М.В. Этиламид циклического додекапептида, обладающий способностью специфически связываться с антителами к белку gp41 вируса иммунодефицита человека первого типа HIV-1-LAV-ELI: А. с. СССР 1542018 // Б. И. 1989.
7. Виноградов В.А., Покровский В.В., Тищенко В.А., Титов М.И., Беспалова Ж.Д., Сакс Т.Р., Овчинников М.В., Семенов А.Н., Пекелис Б.Л., Молокоедов А.С., Носков Ф.С., Полосатов М.В., Суворова З.К. Этиламид циклического додекапептида, обладающий способностью специфически связываться с антителами к белку gp41 вируса иммунодефицита человека первого типа HIV-1-Z-3: А. с. СССР 1527876 // Б. И. 1989.
8. Gausepohl H., Kraft M., Frank R.W. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1989. V. 34. P. 287–294.
9. Stewart J.M., Young J.D. *Solid Phase Peptide Synthesis*. 2 Ed. N. Y.: Pierce Chem. Company, 1984.
10. Fujii N., Otaka A., Watanabe T., Okamachi A., Tamamura H., Yajima H., Inagaki Y., Namizu M., Asano K. // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1989. P. 283–284.
11. Fujii N., Otaka A., Funakoshi S., Bessho K., Yajima H. // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1987. P. 163–164.

Hydrogen Peroxide for Disulfide Bridge Formation in Peptides with the Immunodominant Epitope Sequences of HIV gp41 Glycoproteins

M. V. Sidorova,¹ E. V. Kudryavtseva, M. L. Antopol'skii, M. E. Pal'keeva,
M. V. Ovchinnikov, and Zh. D. Bespalova

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

Abstract—A simple, rapid, and highly efficient method for intramolecular disulfide formation in tryptophan-containing peptides using hydrogen peroxide was elaborated. Solid phase synthesis of the peptide fragment corresponding to 601–617 sequence of transmembrane gp41 glycoprotein of HIV-1 was performed by Fmoc-technique. Coupling of Fmoc-Asn-OH by DCC-HOBt method was shown to be accompanied by a side reaction of dehydration of asparagine amide function with the formation of side product (22%) containing 3-cyanoalanine residue. This side reaction was not observed, when Fmoc-Asn-OH was coupled in the form of its *p*-nitrophenyl ester and with HOBt as a catalyst.

Key words: antigen determinants of HIV proteins, disulfide bond, hydrogen peroxide, solid phase synthesis, 3-cyanoalanine.

¹ To whom correspondence should be addressed.