



УДК 578.833.27/112.083.3

## ЭФФЕКТИВНАЯ СХЕМА СИНТЕЗА ПРИРОДНЫХ $\alpha$ -КОНОТОКСИНОВ И ИХ АНАЛОГОВ

© 2001 г. М. Н. Жмак<sup>#</sup>, И. Е. Кашеверов, Ю. Н. Уткин,  
В. И. Цетлин, О. М. Вольпина, В. Т. Иванов

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

Поступила в редакцию 07.07.2000 г. Принята к печати 10.10.2000 г.

Предложена эффективная схема синтеза  $\alpha$ -колотоксинов, содержащих 12–18 а. о. и две дисульфидные связи, в которой: 1) не используются ортогональные защиты для остатков цистеина; 2) уменьшено число стадий в цикле операций по наращиванию пептидной цепи твердофазным методом; 3) получение линейного продукта высокой степени чистоты позволяет использовать его без очистки на стадии замыкания дисульфидных связей, проводимого при pH 10, что значительно уменьшает время окисления и дает целевой продукт с высоким выходом. По этой схеме осуществлен синтез ряда природных  $\alpha$ -колотоксинов (GI, ImI, EI, MII и SIA), действующих на мышечные и нейрональные никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (АХР) разного типа, а также их новых аналогов ([Tyr10]ImI, [Gln12]GI, [Ser1]GI), в дальнейшем использованных при установлении пространственных структур  $\alpha$ -колотоксинов методом <sup>1</sup>H-ЯМР и изучении лигандсвязывающих центров соответствующих рецепторов.

*Ключевые слова:*  $\alpha$ -колотоксин; пептиды синтетические; твердофазный синтез; дисульфидная связь; никотиновые ацетилхолиновые рецепторы.

### ВВЕДЕНИЕ

Пептидные нейротоксины из ядовитых морских ракушек семейства Conus – незаменимые инструменты для изучения различных рецепторов и ионных каналов [1–4]. Так, например,  $\alpha$ -колотоксины способны селективно блокировать мышечные или нейрональные никотиновые ацетилхолиновые рецепторы различных типов [4]. Несомненный интерес представляет установление пространственных структур природных  $\alpha$ -колотоксинов, получение аналогов с более высокой эффективностью и селективностью действия, а также  $\alpha$ -колотоксинов, несущих различные метки, что расширяет возможности использования этих соединений для изучения рецепторов.

$\alpha$ -Колотоксины – пептиды, содержащие 12–18 а. о. и две дисульфидные связи, их структура схематично может быть изображена следую-

щим образом:  $X_{1-3}C^1C^2X_{3-4}C^3X_{3,5-7}C^4$  (где X – аминокислотные остатки, в подстрочном индексе указано их возможное число). Синтез соединений этого класса высокой степени чистоты в полупрепаративных количествах является серьезной проблемой.

До недавнего времени  $\alpha$ -колотоксины получали главным образом твердофазным методом с использованием ортогональных защит для двух пар цистеинов (первый-третий, второй-четвертый), образующих впоследствии две дисульфидные связи [5–15]. При этом для защиты тиольной функции первой пары цистеинов используются кислотолabile группы (MBzl и Trt в случае Boc- и Fmoc-схем, соответственно), которые отщепляются при деблокировании пептида вместе с остальными защитными группами. Вторая пара цистеинов, напротив, защищена кислотостабильными группами (как правило, Acst), которые селективно удаляют с одновременным образованием дисульфидной связи только после того, как была образована дисульфидная связь между первым и третьим цистеинами. Описанная стратегия обладает несомненным достоинством: в конце синтеза получается индивидуальное соединение с известным расположением дисульфидных связей. Недостаток этого способа в многостадийности; в результате неизбежные потери приводят к низкому

Сокращения: Acst – ацетамидометил; DIPCDI – *N,N'*-диизопротилкарбодимид; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; НОВТ – 1-гидроксибензотриазол; MBzl – метилбензил; МВНА – *n*-метилбензгидриламинопolyмер; ТВТУ – тетрафторборат (2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилмочевины; Ринк-полимер – 4-[(2,4'-диметоксифенил)-(Fmoc-амино)метил]феноксипolyмер; АХР – ацетилхолиновый рецептор.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 336-57-77; e-mail: zhmak@ibch.ru).

Таблица 1. Молекулярные массы и времена удерживания  $\alpha$ -конотоксинов и их аналогов, синтезированных в работе

$\alpha$ -Конотоксин	Аминокислотная последовательность*	Молекулярная масса		Время удерживания по данным аналитической ВЭЖХ, мин
		вычисленная	по данным МС, [M + H] <sup>+</sup>	
GI	ECCNPACGRHYSC	1438.97	1437.8	27.0
[Ser1]GI	SCCNPACGRHYSC	1396.5	1395.1	27.2
[Gln12]GI	ECCNPACGRHYQC	1477.51	1477.72	30.3
ImI	GCCSDPRCAWRC	1350.48	1350.71	26.0
[Tyr10]ImI	GCCSDPRCA YRC	1329.53	1327.88	27.4
SIA	YCCHPACGKNFKC	1468.77	1469.3	28.7
MII	GCCSNPVCHLEHSNLC	1712.3	1711.2	34.2
EI	RDOCCYHPTCNMSNPQIC	2092.4	2093.5	26.8

\* Все  $\alpha$ -конотоксины получены в виде амидов и имеют дисульфидные связи Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>3</sup> и Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>4</sup>; O – гидроксипролин.

выходу конечного продукта (по данным литературы не более 10% в расчете на стартовую C-концевую аминокислоту [16, 17]).

Нами разработана эффективная схема синтеза  $\alpha$ -конотоксинов, не требующая применения ортогональных защит для остатков цистеина и дающая высокие выходы конечных продуктов (до 45% в расчете на стартовую C-концевую аминокислоту), по которой получен ряд природных  $\alpha$ -конотоксинов (их синтезы были описаны ранее в работах [7, 13, 14, 18, 19]), а также нескольких новых аналогов (табл. 1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

$\alpha$ -Конотоксины GI, EI и SIA действуют на АХР мышечного типа, присутствующие в мышцах млекопитающих и в клетках электрического органа ската *Torpedo californica* [4].  $\alpha$ -Конотоксин GI имеет различное сродство к двум лигандсвязывающим участкам, располагающимся в областях контакта  $\alpha/\gamma$ - и  $\alpha/\delta$ -субъединиц АХР [4, 20]. Синтетический  $\alpha$ -конотоксин GI послужил в качестве исходного соединения для получения иодированных производных, используемых в наших исследованиях АХР [21]. Особенности  $\alpha$ -конотоксинов EI и SIA в том, что они взаимодействуют почти исключительно лишь с одним из участков связывания в АХР *Torpedo* –  $\alpha/\delta$  или  $\alpha/\gamma$ , соответственно [19, 22].  $\alpha$ -Конотоксин ImI проявляет селективность по отношению к нейрональному пентаолигомерному АХР, состоящему из так называемых  $\alpha 7$ -субъединиц [23]. Наличие значительных количеств синтетического  $\alpha$ -конотоксина ImI позволило установить его пространственную структуру методом <sup>1</sup>H-ЯМР [24] раньше, чем это было сделано в зарубежных лабораториях [25, 26]. Мы также осуществили синтез  $\alpha$ -конотоксина MII, поскольку недавно было показано, что он с высоким сродством связывается с нейрональными

АХР, состоящими из  $\alpha 3$ - и  $\beta 2$ -субъединиц [7]. Синтез аналогов преследовал разные цели: в случае ImI замена Trp10 на Tyr позволила получить биологически активный аналог, сохранивший активность и при последующем иодировании, что дало соединение, пригодное для радиолигандного анализа нейронального  $\alpha 7$ -АХР [27]. Замены в  $\alpha$ -конотоксине GI в указанных положениях (см. табл. 1) были произведены для того, чтобы оценить роль боковых цепей остатков 1 и 12 в образовании в растворе двух конформеров природного  $\alpha$ -конотоксина GI [28].

Построение пептидной цепи было выполнено стандартным твердофазным методом на полимере Ринка [29] (синтезы GI, MII, SIA) и на *n*-метилбензгидриламинопolyмере (синтезы ImI, EI, [Tyr10]ImI, [Gln12]GI, [Ser1]GI). Полимерные матрицы были выбраны с учетом необходимости получения амидов  $\alpha$ -конотоксинов. Во всех случаях использована Fmoc-схема синтеза. Стандартный протокол цикла [30] изменен на более короткий и экономичный, включающий 6 стадий вместо обычных 17 [31]. Использование короткого протокола оправдано для небольших пептидов, когда существенное уменьшение времени синтеза и расхода реактивов не сопровождается снижением выходов реакций и падением степени гомогенности синтетического продукта.

Одновременное применение *n*-метилбензгидриламинопolyмера и Fmoc-производных аминокислот (синтезы ImI, EI, [Tyr10]ImI, [Gln12]GI и [Ser1]GI) позволило использовать двухступенчатую процедуру деблокирования и отщепления пептида от полимера: на первой стадии происходило отщепление всех защитных групп боковых цепей аминокислот в мягких условиях трифторуксусной кислотой, а на второй – отщепление пептида от полимера в более жестких условиях фтористым водородом. Такая схема позволяет избежать побочных реакций с участием карбока-

тионов, образующихся при отщеплении защитных групп фтористым водородом.

Синтез  $\alpha$ -конотоксинов GI, MII и SIA был осуществлен на полимере Ринка; деблокирование с одновременным отщеплением защитных групп проводили трифторуксусной кислотой. По данным аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ, содержание основного продукта деблокирования во всех случаях составило более 80%.

Для проведения реакции окислительного замыкания двух S-S-связей пептиды были использованы без дополнительной очистки. Окисление проводили кислородом воздуха, при этом в стандартную методику замыкания S-S-связей были внесены изменения: значение pH раствора пептида было увеличено с 7.5 (литературные данные [18]) до 10, что позволило уменьшить время реакции с 36–72 до 18–35 ч, но не сопровождалось значительным образованием нежелательных продуктов окисления. Процесс окисления контролировали при помощи теста Эллмана. Полученные  $\alpha$ -конотоксины очищали с использованием препаративной ВЭЖХ. Все синтезированные соединения были охарактеризованы данными аналитической ВЭЖХ, масс-спектрометрии (табл. 1) и аминокислотного анализа.

В результате были получены природные  $\alpha$ -конотоксины ImI, GI, MII и SIA с высокими выходами (22–47% в расчете на стартовую аминокислоту), причем при их хроматографическом выделении основному пику соответствовал целевой продукт. Правильность замыкания дисульфидных связей в  $\alpha$ -конотоксинах ImI, GI и его аналогах была подтверждена с помощью ЯМР-спектроскопии [24, 28].

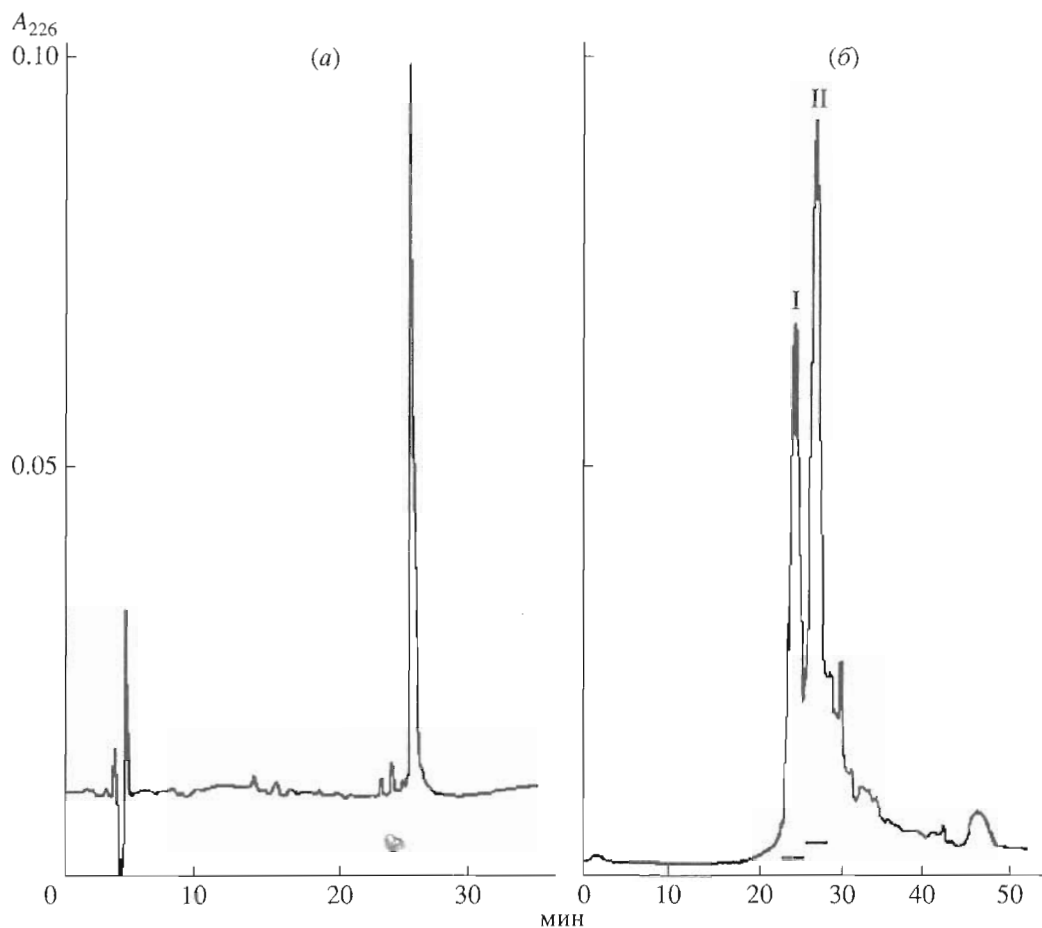
Окисление линейного предшественника  $\alpha$ -конотоксина EI, содержащего остаток гидроксипролина, привело к образованию трех изомеров с различным расположением S-S-мостиков. Единственный описанный в литературе синтез  $\alpha$ -конотоксина EI также сопровождался получением трех изомеров [19], при этом изомер, образующийся с наибольшим выходом, соответствовал нативному токсину. Мартинез и др. [19] полагают, что замыкание дисульфидных связей этого соединения в природе происходит на стадии более длинного предшественника, а модификация Pro3 в гидроксипролин происходит после замыкания дисульфидных связей. Для изомеров  $\alpha$ -конотоксина EI, выделенных с помощью ВЭЖХ, нами была исследована их способность ингибировать связывание [ $^{125}$ I]- $\alpha$ -конотоксина GI с мембранными препаратами АХР *T. californica* (неопубликованные данные). Один из изомеров существенно уступал остальным двум по активности (в 5–8 раз), тогда как наиболее активным оказался изомер, получающийся с наибольшим выходом. С учетом аналогичных данных работы [19] это позволяет считать его отвечающим природному  $\alpha$ -конотоксину EI.

Следует отметить, что при одновременном замыкании двух дисульфидных связей в пептиде, соответствующем последовательности  $\alpha$ -конотоксина ImI, образовывался преимущественно именно природный изомер (рисунок, а), в случае же [Tyr10]ImI-аналога было получено два изомера в сопоставимых количествах (40 : 60, рисунок, б, пики I и II). Опыты на ооцитах *Xenopus*, в которых была проведена гетерологичная экспрессия  $\alpha$ 7-субъединицы АХР крысы (выполненные д-ром К. Метфесселем, Байер, Леверкузен), показали, что изомер (II) ингибирует индуцируемые ацетилхолином токи практически с такой же эффективностью, что и  $\alpha$ -конотоксин ImI, тогда как активность изомера (I) была, как минимум, на порядок ниже [27]. Таким образом, результаты анализа биологической активности позволяют считать, что расположение S-S-связей в изомере (II) соответствует таковому в природном  $\alpha$ -конотоксине ImI.

Аналогичным образом, и в случае  $\alpha$ -конотоксина GI отступления от природной аминокислотной последовательности (замены Glu1 на Ser и Ser12 на Gln) привели к тому, что в результате одновременного замыкания двух дисульфидных связей не происходило преимущественного образования природного изомера. В обоих случаях в сопоставимых количествах были получены по две изомерные формы. Исследование способности этих пептидов конкурировать с радиоактивным  $\alpha$ -бунгаротоксином за связывание с АХР в мембранных препаратах электрического органа ската *T. californica* показало, что один из изомеров [Ser1]GI и [Gln12]GI близок природному  $\alpha$ -конотоксину GI, а другой не активен (данные не представлены).

С помощью  $^1$ H-ЯМР (И. Масленников, неопубликованные данные) было установлено, что биологически активные изомеры [Ser1]GI и [Gln12]GI имеют такое же расположение дисульфидных связей, что и природный  $\alpha$ -конотоксин GI и, следовательно, являются целевыми аналогами последнего.

Таким образом, разработанная нами схема синтеза, в которой уменьшено число стадий, исключена промежуточная очистка линейных пептидов и проводится сравнительно быстрое одностадийное замыкание обеих дисульфидных связей, позволила за короткое время и с высоким выходом получить значительные количества ряда природных  $\alpha$ -конотоксинов для структурных и структурно-функциональных исследований. Можно полагать, что эта схема окажется полезной и для получения других биологически активных коротких пептидов, содержащих две дисульфидные связи, таких, как апамины или эндотелины. Эта схема в целом пригодна и для синтеза аналогов  $\alpha$ -конотоксинов, если в распоряжении исследователей имеются возможности с помощью структурного



Аналитическая ВЭЖХ синтетического  $\alpha$ -конотоксина ImI (а) и его аналога [Tyr10]ImI (б) (колонка Nucleosil C<sub>18</sub> (4.6 × 150 мм), линейный градиент ацетонитрила от 10 до 60% за 30 мин в 0.1% TFA).

анализа или функциональных тестов идентифицировать изомер с природным расположением дисульфидных связей. В противном случае оправдано использование ортогональных защит и последовательное замыкание дисульфидных связей.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные аминокислот, реактивы и растворители фирм Bachem, Fluka (Швейцария), Reanal (Венгрия), а также Ринк-полимер, МВНА-полимер, ТВТУ (все – Bachem). Для синтеза применяли N<sup>α</sup>-Fmoc-производные трифункциональных аминокислот: Ser(Bu'), Thr(Bu'), Glu(OBu'), Asp(OBu'), Tyr(Bu'), Arg(Mtr), Cys(Trt), His(Trt), Lys(Boc).

Стартовую аминокислоту присоединяли к полимеру, используя 5-кратный избыток активированного эфира соответствующей аминокислоты.

Наращивание полипептидной цепи проводили, выполняя следующий протокол операций для каждого цикла синтеза: 1) DMF (2 × 3 мин); 2) 50% пиперидин в DMF (15 мин); 3) DMF (3 × 3 мин); 4) ди-

оксан–вода (2 : 1) (2 × 3 мин); 5) DMF (2 × 3 мин); 6) реакция конденсации (40–60 мин).

Активацию защищенной аминокислоты проводили с помощью ТВТУ- или НОВТ–DIPCDI-метода. В случае ТВТУ-метода к смеси 1 экв. аминокислоты и 1 экв. ТВТУ в DMF добавляли 1.2 экв. диизопропилэтиламина и после перемешивания в течение 5 мин реакционную смесь добавляли к пептидилполимеру; в другом варианте к аминокислоте и НОВТ (1 : 1) в DMF добавляли 1 экв. DIPCDI и через 10 мин смесь объединяли с пептидилполимером. В реакции конденсации использовали 3-кратные избытки активированной аминокислоты.

Деблокирование и отщепление пептидов, синтезированных на *n*-метилбензгидриламинопере, проводили в два этапа. На первом этапе пептидилполимер обрабатывали в течение 2 ч при комнатной температуре 10 мл смеси TFA–этандитиол–диметилсульфид–*m*-крезол (9 : 0.3 : 0.3 : 0.3). На втором этапе пептид отщепляли от полимера 5 мл смеси HF–*m*-крезол (9 : 1) при 0°C в течение 1 ч. После упаривания HF пептид осаждали эфи-

Таблица 2. Синтез  $\alpha$ -конотоксинов

$\alpha$ -Конотоксин	Носитель	Количество, мг	Содержание аминокислот на полимере, ммоль/г	Время замыкания дисульфидных связей, ч	Выход*	
					мг	%
GI	Полимер Ринка	200	0.42	24	30	24.8
SIA	То же	»	»	»	58	47.0
МII	»	400	»	35	129	44.8
ImI	МВНА-полимер	230	0.48	18	33	22.0
[Tyr10]ImI	То же	»	»	»	(26)	24.5 (17.7)
EI	»	100	1.0	»	(42)	28.0 (20.0)
[Ser1]GI	»	»	»	»	(26.4)	27.0 (18.9)
[Gln12]GI	»	»	»	»	(25.8)	24.9 (17.5)

\* В расчете на стартовую аминокислоту; в скобках приведен выход целевого изомера.

ром, сушили на фильтре и затем растворяли в 200 мл смеси  $H_2O$ –изопропанол (1 : 1), значение pH раствора доводили до 10 добавлением диизопропилэтиламина. Процесс окисления контролировали при помощи теста Элмана [32], реакция завершалась за 18–35 ч. Значение pH раствора доводили до 5 добавлением уксусной кислоты. Затем упаривали до малого объема, разбавляли водой и лиофилизировывали.

Деблокирование и отщепление пептидов, синтезированных на полимере Ринка, проводили 5 мл смеси ТФА–этандитиол–диметилсульфид–*m*-крезол (9 : 0.3 : 0.3 : 0.3) в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Избыток трифторуксусной кислоты упаривали при пониженном давлении. Продукт осаждали безводным холодным эфиром, сушили на фильтре и экстрагировали 100 мл 10% уксусной кислоты, раствор лиофилизировывали. Сырой продукт растворяли в смеси  $H_2O$ –изопропанол (1 : 1) (концентрация 1 мг/мл), далее обрабатывали так же, как и в предыдущем случае. Данные по синтезу  $\alpha$ -конотоксинов и их аналогов суммированы в табл. 2.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке Nucleosil  $C_{18}$  (4.6  $\times$  150 мм) в линейном градиенте ацетонитрила от 10 до 60% за 50 мин в 0.1% ТФА при скорости потока 1 мл/мин (табл. 1). Препаративную ВЭЖХ осуществляли на колонке Nucleosil  $C_8$  (10  $\times$  250 мм) в линейном градиенте ацетонитрила от 10 до 60% за 50 мин в 0.1% ТФА при скорости потока 4 мл/мин. Элюат контролировали измерением поглощения при 226 нм.

Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Vision 2000 (ThermoBio Analysis, США); ЯМР-спектры – на приборе Varian Unity 600. Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (Германия) после кислотного гидролиза пептидов смесью ТФА–HCl (1 : 1) при 165°C в течение 1 ч.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Myers R.A., Cruz L.J., Rivier J.E., Olivera B.M. // *Chem. Rev.* 1993. V. 93. P. 1923–1936.
2. Olivera B.M., Rivier J.E., Scott J.K., Hillyard D.R., Cruz L.J. // *Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 22067–22070.
3. Hucho F., Tsetlin V.I., Machold J. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 239. P. 539–557.
4. McIntosh J.M., Santos A.D., Olivera B.M. // *Annu. Rev. Biochem.* 1999. V. 68. P. 59–88.
5. Zhang R., Snyder G.H. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 11343–11348.
6. Almqvist R.G., Kadambi S.R., Yasuda D.M., Weill F.L., Polgar W.E., Toll L.R. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1989. V. 34. P. 455–462.
7. Cartier G.E., Yoshikami D., Gray W.R., Luo S., Olivera B.M., McIntosh J.M. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 7522–7528.
8. Gray W.R., Rivier J.E., Galyean R., Cruz L.J., Olivera B.M. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 12247–12251.
9. Shon K.J., Grilley M.M., Marsh M., Yoshikami D., Hall A.R., Kurz B., Gray W.R., Imperial J.S., Hillyard D.R., Olivera B.M. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 4913–4918.
10. Price-Carter M., Hull M.S., Goldenberg D.P. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 9851–9861.
11. Groebe D.R., Gray W.R., Abramson S.N. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 6469–6474.
12. Quiram P.A., Sine S.M. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 11001–11006.
13. Myers R.A., Zafaralla G.C., Gray W.R., Abbott J., Cruz L.J., Olivera B.M. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 9370–9377.
14. Gray W.R., Luque F.A., Galyean R., Atherton E., Sheppard R.C., Stone B.L., Reyes A., Alford J., McIntosh M., Olivera B.M., Cruz L.J., Rivier J. // *Biochemistry.* 1984. V. 23. P. 2796–2802.
15. Luo S., Kulak J.M., Cartier G.E., Jacobsen R.B., Yoshikami D., Olivera B.M., McIntosh J.M. // *J. Neuroscience.* 1998. V. 18. P. 8571–8579.
16. Akaji K., Fujino K., Tatsumi T., Kiso Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 11384–11392.

17. Кудрявцева Е.В., Сидорова М.В., Евстигнеева Р.П. // Успехи химии. 1998. Т. 67. С. 611–630.
18. McIntosh J. M., Yoshikami D., Mahe E., Nielsen D.B., Rivier J.E., Gray W.R., Olivera B.M. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 16733–16739.
19. Martinez J.S., Olivera B.M., Gray W.R., Craig A.G., Groebe D.R., Abramson S.N., McIntosh J.M. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 14519–14526.
20. Utkin Yu.N., Kobayashi Y., Hucho F., Tsetlin V.I. // Toxicol. 1994. V. 32. P. 1153–1157.
21. Kasheverov I., Zhmak M., Chivilyov E., Saez-Briones P., Utkin Yu., Hucho F., Tsetlin V. // J. Receptor and Signal Transduction Res. 1999. V. 19. P. 559–571.
22. Hann R.M., Pagan O.R., Gregory L.M., Jacome T., Eterovich V.A. // Biochemistry. 1995. V. 36. P. 9051–9056.
23. Johnson D.S., Martinez J., Egloyhen A.B., Henemann S.S., McIntosh J.M. // Mol. Pharmacol. 1995. V. 48. P. 194–199.
24. Maslennikov I.V., Shenkarev Z.O., Zhmak M.N., Ivanov V.T., Methfessel C., Tsetlin V.I., Arseniev A.S. // FEBS Lett. 1999. V. 444. P. 275–280.
25. Gouda H., Hirono S. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1431. P. 384–394.
26. Gehrman J., Daly N.L., Alewood P.F., Craik D.J. // J. Med. Chem. 1999. V. 42. P. 2364–2372.
27. Utkin Yu.N., Zhmak M.N., Methfessel C., Tsetlin V.I. // Toxicol. 1999. V. 37. P. 1683–1695.
28. Maslennikov I.V., Sobol A.G., Gladky K.V., Lugovskoy A.A., Ostrovsky A.G., Tsetlin V.I., Ivanov V.T., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 254. P. 238–247.
29. Rink H. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. P. 3787–3790.
30. Udenfriend S., Meienhofer J. // The Peptides. 1987. V. 9. P. 28.
31. Butner K., Zahn H., Fisher W.H. // Proceedings of the Tenth American Peptide Symp. May 23–28. St. Louis. Missouri. USA. 1987. P. 210–211.
32. Riddles P.W., Blakeley R.L., Zerner B. // Anal. Biochem. 1979. V. 94. P. 75–81.

## An Efficient Synthetic Scheme for Natural $\alpha$ -Conotoxins and Their Analogues

M. N. Zhmak<sup>#</sup>, I. E. Kasheverov, Yu. N. Utkin, V. I. Tsetlin, O. M. Vol'pina, and V. T. Ivanov

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

An efficient scheme for the synthesis of  $\alpha$ -conotoxins, containing 12–18 amino acid residues and two disulfide bridges, was proposed. Its advantages are: (1) the avoidance of orthogonal protections of Cys residues; (2) a lower number of stages in a cycle of the peptide chain elongation by the method of solid phase synthesis; (3) the linear product is sufficiently pure for being used at the next stage of the disulfide bond formation without additional purification; and (4) a substantially reduced time of oxidation to disulfides at pH 10, which led to the target product in a high yield. A number of natural  $\alpha$ -conotoxins (GI, ImI, EI, MII, and SIA), affecting the muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors of various types, and several new analogues of these conotoxins (in particular, [Tyr10]ImI, [Gln12]GI, and [Ser1]GI) were synthesized by this scheme. They were used for elucidating the spatial structure of  $\alpha$ -conotoxins by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and for studying the ligand-binding sites of their receptors.

*Key words:*  $\alpha$ -conotoxin, disulfide bond, nicotinic acetylcholine receptors, solid phase peptide synthesis, synthetic peptides

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-5777; e-mail: zhmak@ibch.ru.

The full English version of the paper is published in *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 2, and is also available (free) at <http://www.maik.ru/>.