



УДК 578.832.1.A:578.22:577.112.6

**СИНТЕЗ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА  
ВИРУСА ГРИППА A/Aichi/2/68 (H3N2)****Самуков В. В., Калашиников В. В., Офицеров В. И.,  
Швалье А. Ф.***Всероссийский научно-исследовательский институт молекулярной биологии,  
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Синтезированы пептиды, соответствующие участкам 122–133, 136–147 и 154–164 тяжелой цепи гемагглютиниона вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Синтез проведен методом ступенчатого наращивания пептидной цепи активированными эфирами Вос-аминокислот и конденсацией пептидных блоков карбодимидным методом в растворе. Для защиты С-концевых карбоксильных групп пептидов и пептидных блоков использована удаляемая основаниями окрашенная 2-[4-(фенилазо)бензилсульфонил]-этильная группа, облегчающая очистку синтезируемых пептидов. После удаления N- и С-концевых защитных групп пептиды были деблокированы 1 М трифторметансульфокислотой в трифторуксусной кислоте, содержащей 10% тиоанизола, и очищены препаративной обращенно-фазовой хроматографией. Получены конъюгаты синтезированных пептидов с бычьим сывороточным альбумином.

В связи с трудностями получения и применения живых, убитых и субъединичных вакцин в последние годы широкое внимание исследователей привлекает идея создания синтетических вакцин [1, 2], использующих в качестве антигенного материала синтетические пептиды, имеющие аминокислотную последовательность антигенных детерминант нативного белка и моделирующие каким-либо образом их пространственную структуру. Иммунизация животных такими пептидами, конъюгированными с различными носителями, может вызвать паработку антител, способных к связыванию и нейтрализации нативного антигена, например вируса или токсина. Перспективы и проблемы такого подхода активно обсуждаются в литературе [2, 3], имеется ряд примеров успешного получения и исследования синтетических вакцинных препаратов против вирусов ящура [4], гриппа [5], дифтерийного токсина [6] и некоторых других инфекционных агентов.

Гемагглютинин вируса гриппа — один из наиболее изученных протективных вирусных антигенов. Определена аминокислотная последовательность гемагглютининов многих штаммов вируса гриппа, различными методами изучена их антигенная структура (см., например, обзор [7]). На основании данных рентгеноструктурного анализа установлена пространственная структура гемагглютиниона штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) и выявлены элементы этой структуры, наиболее вероятно являющиеся антигенными детерминантами [8].

Настоящая работа посвящена синтезу пептидов, имеющих аминокислотные последовательности некоторых предполагаемых антигенных детерминант тяжелой цепи гемагглютиниона вируса гриппа A/Aichi/2/68,

---

Приятые сокращения: Acm — ацетамидометил, Bzl — бензил, Mts — мезитиленсульфонил, Вос — *tert*-бутилоксикарбонил, Z — бензилоксикарбонил, DCC — дициклогексилкарбодимид, НОВТ — 1-оксипензотриазол, HA — гемагглютинин, ONp — *n*-нитрофенокси, Pse — 2-[4-(фенилазо)бензилсульфонил]этил, SPDP — N-оксисуццинимидный эфир 3-(2-пиридилдитто)пропионовой кислоты, TMS — триметилсилил, DMF — диметилформамид, БСА — бычий сывороточный альбумин, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография.

и конъюгированию этих пептидов с белком-носителем БСА для иммунизации. Синтезированные пептиды имеют следующую структуру:

Thr-Glu-Gly-Phe-Thr-Trp-Thr-Gly-Val-Thr-Gln-Asn-Cys (122–133)

Ser-Asn-Ala-Cys-Lys-Arg-Gly-Pro-Gly-Ser-Gly-Phe (136–147)

Leu-Thr-Lys-Ser-Gly-Ser-Thr-Tyr-Pro-Val-Leu-Cys (154–164)-1

Leu-Thr-Lys-Ser-Glu-Ser-Thr-Tyr-Pro-Val-Leu-Cys (154–164)-2

Последовательности 122–133 и 136–147 вместе составляют почти полную структуру детерминанты А [8], последовательность 154–164 представляет часть детерминанты В. Поскольку для штамма А/Aichi/2/68 известны варианты гемагглютинаина, имеющие в положении 158 как Gly, так и Glu, синтезированы оба варианта последовательности 154–164. Подчеркнутые остатки Cys введены в пептиды для конъюгирования с БСА.

Для синтеза пептидов были избраны схемы, сочетающие ступенчатое наращивание пептидной цепи активированными эфирами Вос-аминокислот и конденсацию пептидных фрагментов в растворе. В качестве С-концевой защитной группы использовали окрашенную Pse-группу. Эта защитная группа, удаляемая основаниями по механизму β-элиминирования, впервые была использована для синтеза соматостатина методом активированных эфиров [9]. Авторы, предложившие Pse-группу для защиты С-концевой карбоксильной группы, отметили следующие ее достоинства:

а) оранжевая окраска Pse-группы позволяет легко анализировать полноту протекания реакций и чистоту продуктов тонкослойной хроматографией;

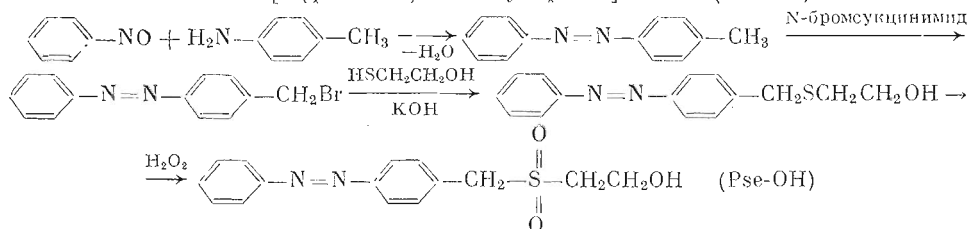
б) Pse-группа снижает растворимость пептидов в большинстве органических растворителей, в то же время их растворимость в DMF и CF<sub>3</sub>COOH остается удовлетворительной. Это позволяет выделять синтезированные пептиды осаждением из реакционной смеси и промыванием осадков водой и органическими растворителями;

в) Pse-группа хорошо сочетается с Вос-группой и удаляется разбавленной водной щелочью в очень мягких условиях.

В работе [9] Pse-группа использовалась в комбинации с щелочелabileнными боковыми защитными группами, которые удалялись одновременно с нею. Представляло интерес исследовать возможность сочетания этой группы с кислотолabileнными защитными группами боковых радикалов аминокислот как в ступенчатом, так и в блочном синтезе пептидов.

Схема 1

Синтез-2-[4-(фенилазо)бензилсульфонил]этанола (Pse-OH)



Поскольку синтез Pse-OH не описан в доступной литературе, мы разработали относительно несложный способ получения этого соединения (схема 1). Pse-Эфиры Вос-аминокислот получали в основном как описано в сообщении [9] для Вос-Cys(Asn)-OPse конденсацией Вос-аминокислот с Pse-OH в присутствии DCC в пиридине. Модификации известного метода заключались в добавлении в реакционную смесь каталитических количеств 4-диметиламинопиридина и дополнительной очистки целевых эфиров хроматографией на силикагеле. Свойства некоторых синтезированных эфиров приведены в табл. 1.

## Физико-химические характеристики Pse-эфиров Boc-аминокислот

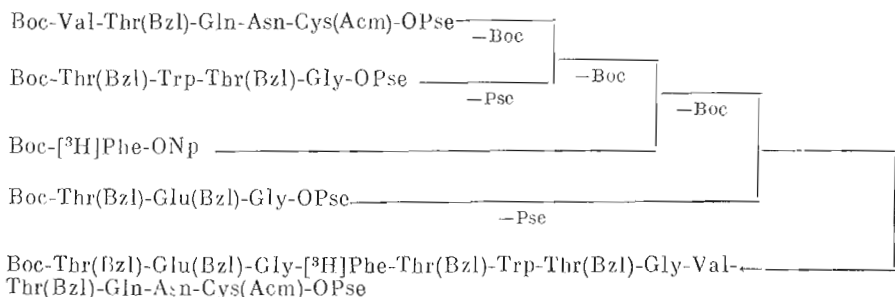
Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$	Растворитель
Boc-Cys(Acm)-OPse	93	63–65	-23,1 *	CH <sub>3</sub> OH (с 1,0)
Boc-Gly-OPse	91	108–110	—	—
Boc-Phe-OPse	94	75–76	-10,1	DMF (с 1,0)
Boc-Lys(Z)-OPse	76	78–79	-9,0	DMF (с 0,5)
Boc-Leu-OPse	91	100–102	-6,1	DMF (с 0,5)
Boc-Pro-OPse	56	146–148	-33,2	CH <sub>3</sub> OH (с 1,0)

\* Лит. данные [9]:  $[\alpha]_D -24,0^\circ$  (с 1,0; CH<sub>3</sub>OH).

В качестве временной N<sup>(α)</sup>-защитной группы в синтезе всех пептидов использовалась Boc-группа. Боковые функции трифункциональных аминокислот, кроме цистеина, защищались группами, стабильными в условиях удаления Boc-защиты и удаляемыми одновременно действием 1 М трифторметансульфокислоты в трифторуксусной кислоте, содержащей 10% тианизол [10]: О-бензиль для Thr, Ser и Trp, γ-бензиловый эфир для Glu, ε-бензилоксикарбонил для Lys, N<sup>6</sup>-мезитилсульфонил для Arg. Цистеин защищали S-ацетамидометильной группой, стабильной в условиях синтеза и кислотного деблокирования и селективно удаляемой ацетатом ртути (II) [11].

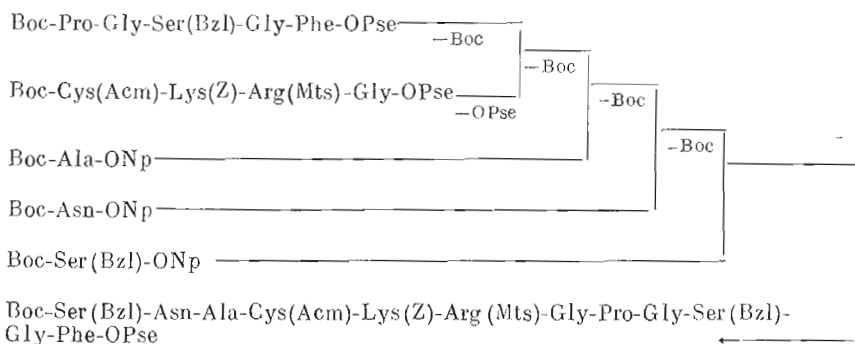
## Схема 2

## Синтез пептида 122—133



## Схема 3

## Синтез пептида 136—147



Пептиды (154–164)-1 и (154–164)-2 были синтезированы методом ступенчатого наращивания пептидной цепи с помощью активированных эфиров. В этих синтезах остатки Ser и Thr вводили в пептидную цепь с незащищенными гидроксильными группами. Пептиды 122–133 и 136–147 синтезировали сочетанием методов ступенчатого наращивания цепи и конденсации пептидных блоков (схемы 2 и 3) с полной защитой боковых радикалов аминокислот. Разбиение этих пептидов на блоки про-

## Защищенные пептиды, синтезированные методом активированных эфиров

Пептид	Общий выход, % *
Вос-Val-Thr(Bzl)-Gln-Asn-Cys(Acm)-OPse	70,8
Вос-Thr(Bzl)-Trp-Thr(Bzl)-Gly-OPse	67,0
Вос-Thr(Bzl)-Glu(Bzl)-Gly-OPse	72,8
Вос-Pro-Gly-Ser(Bzl)-Gly-Phe-OPse	47,5
Вос-Cys(Acm)-Lys(Z)-Arg(Mts)-Gly-OPse	56,5
Вос-[ <sup>14</sup> C]Leu-Thr-Lys(Z)-Ser-Gly-Ser-Thr-Tyr(Bzl)-Pro-Val-Leu-Cys(Acm)-OPse	33,5
Вос-[ <sup>14</sup> C]Leu-Thr-Lys(Z)-Ser-Glu(Bzl)-Ser-Thr-Tyr(Bzl)-Pro-Val-Leu-Cys(Acm)-OPse	35,5

\* Общий выход пептида в пересчете на Pse-эфир первой аминокислоты.

Таблица 3

## Аминокислотный состав синтезированных пептидов \*

Аминокислотный остаток	Пептид			
	136—147	122—133	(154—164)-1	(154—164)-2
Asx	1,00(1)	1,00(1)		
Ser	1,74(2)		2,15(2)	2,12(2)
Pro	1,04(1)		0,96(1)	1,02(1)
Gly	3,03(3)	2,00(2)	0,93(1)	
Ala	1,04(1)			
Phe	0,99(1)	0,97(1)		
Lys	1,07(1)		1,06(1)	1,03(1)
Arg	1,09(1)			
Glx		2,00(2)		1,03(1)
Thr		2,94(4) **	1,99(2)	1,87(2)
Val		1,00(1)	0,98(1)	0,93(1)
Leu			1,90(2)	1,90(2)
Tyr			0,90(1)	0,91(1)

\* Trp и Cys не определялись.

\*\* Наличие четырех остатков Thr подтверждено данными секвенирования по Эдману.

водили таким образом, чтобы, во-первых, исключить возможность рацемизации, во-вторых, ввести радиоактивную метку в синтезируемый пептид на одной из последних стадий синтеза. Синтез каждого пептида начинали с трифторацетата Pse-эфира С-концевой аминокислоты и наращивали пептидную цепь активированными эфирами Вос-аминокислот, Вос-Ser, Вос-Thr и Вос-Arg(Mts) вводили в синтез в виде пентахлорфениловых эфиров, остальные Вос-аминокислоты — в виде *n*-нитрофениловых эфиров. Реакцию ацилирования проводили в пиридине или DMF с использованием 1,2—2 экв. активированного эфира в присутствии 2 экв. НОВТ и 2 экв. *N*-метилморфолина [9]. После упаривания реакционной смеси остаток растирали с водой до затвердения, промывали водой, изопропанолом и эфиром. При необходимости пептиды дополнительно очищали переосаждением из ацетона или DMF эфиром. Такой метод обычно давал хроматографически чистые продукты с выходами 72—98%. Лишь при синтезе пептида Вос-Cys(Acm)-Lys(Z)-Arg(Mts)-Gly-OPse промежуточный дипептид Вос-Arg(Mts)-Gly-OPse оказался хорошо растворим в изопропанол и эфире и поэтому был очищен колоночной хроматографией на силикагеле. Вос-защиту удаляли растворением пептида в безводной CF<sub>3</sub>COOH при 0—5° С, при деблокировании тирозин- и триптофансодержащих пептидов к CF<sub>3</sub>COOH добавляли 5% анизол и 3% трифенилфосфина.

Полноту ацилирования и чистоту продуктов при синтезе ди- — тетрапептидов анализировали тонкослойной хроматографией. Оранжевые пятна

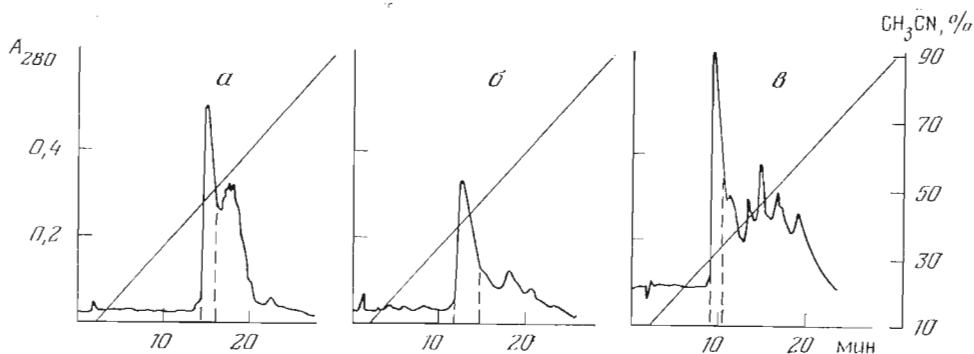


Рис. 1

Рис. 1. Выделение деблокированных пептидов 122–133 (а), (154–164)-1 (б) и (154–164)-2 (в) препаративной ВЭЖХ на колонке 10×250 мм с TMS-силикагелем (10 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила (5→90%, общий объем 120 мл) в 0,1%  $\text{CF}_3\text{COOH}$ . Скорость элюции 4 мл/мин

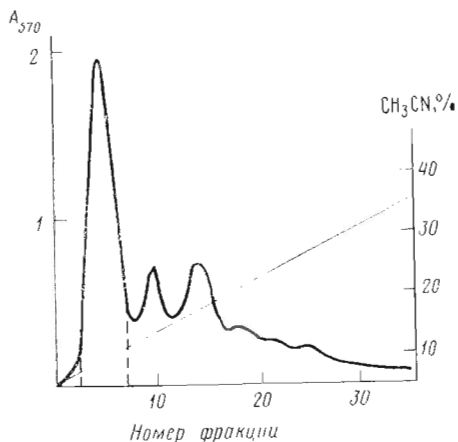


Рис. 2. Выделение пептида 136–147 препаративной ВЭЖХ на колонке (15×300 мм) с TMS-силикагелем (40–60 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила (5→40%, 800 мл) в 0,5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Скорость элюции 200 мл/ч. Объем фракций 20 мл. Содержание пептидного материала во фракциях измеряли после обработки аликуот (0,1 мл) пингидриновым реактивом [13]

Рис. 2

исходного аминокомпонента и продукта реакции хорошо видны на пластинке в видимом и УФ-свете. По мере удлинения цепи растворимость пептидов в хроматографических системах резко снижается, что затрудняет их анализ тонкослойной хроматографией. В таких случаях точную аликвоту реакционной смеси обрабатывали эфиром в центрифужной пробирке и анализировали содержание остаточных первичных аминогрупп в осадке пингидриновым методом Кайзера [12] в модификации Сарина с сотр. [13], предложенной для количественной оценки полноты ацилирования в твердофазной синтезе пептидов. Предварительные эксперименты показали, что этот метод позволяет с достаточной точностью и воспроизводимостью оценить содержание аминогрупп в гелеобразных осадках труднорастворимых пептидов. Чистота синтезированных пептидов анализировалась также обращенно-фазовой ВЭЖХ после удаления Вос- и Pse-защит и составляла 94–99% по УФ-поглощению при 220 и 280 нм. Аминокислотный состав защищенных пептидов, определенный после кислотного гидролиза, соответствовал ожидаемому. Пептиды и пептидные блоки, синтезированные методом активированных эфиров, приведены в табл. 2.

С соответствующих пептидных блоков удаляли Вос- или Pse-защитные группы и полученные фрагменты конденсировали карбодиимидным методом (в присутствии избытка НОВТ). Выделение и анализ продуктов конденсации проводили так же, как и при ступенчатом методе синтеза.

Для удаления Pse-защиты раствор эфира Вос-пептида в водном DMF или ацетоне обрабатывали разбавленной NaOH, как описано в работе [9]. После подкисления и обработки реакционной смеси полученную смесь Вос-пептида и 4-фенилазобензилвинилсульфона разделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Выходы чистых Вос-пептидов составляли

75–90%, однако пептид  $\text{Woc-Thr(Bzl)-Glu(Bzl)-Gly-OH}$  был выделен с низким выходом. Это, по-видимому, свидетельствует о недостаточной стабильности  $\gamma$ -бензилглутамильного остатка в условиях удаления Pse-группы. Интересно, что после удаления Pse-группы растворимость Woc-пептидов в таких растворителях, как изопропанол, этилацетат, хлороформ, существенно повышается.

Для введения радиоактивной метки в пептиды на соответствующих стадиях (см. схемы 2 и 3) использовали *n*-нитрофениловые эфиры Woc-[ $^{14}\text{C}$ ]- или [ $^3\text{H}$ ]аминокислот, синтезированные по обычным методикам [14]. К сожалению, в пептид 136–147 ввести метку таким образом не удалось, так как имевшийся препарат  $L$ -[ $^3\text{H}$ ]Ala оказался неудовлетворительного качества. Поэтому часть защищенного пептида 136–147 после удаления Woc-защиты ацетилировали [ $^{14}\text{C}$ ]уксусным ангидридом. С полученных защищенных пептидов удаляли Woc- и Pse-защитные группы и затем обрабатывали их 1 М раствором трифторметансульфокислоты в смеси  $\text{CF}_3\text{COOH}$  — тиоанизол при  $0^\circ\text{C}$  [10]. После осаждения эфиром деблокированные пептиды очищали препаративной обращенно-фазовой хроматографией на TMS-силикагеле [15] (рис. 1, 2). Чистота полученных пептидов, по данным обращенно-фазовой ВЭЖХ, составляла 95–99%, сохранность остатка Trp в очищенном пептиде 122–133 показана УФ-спектроскопией. Данные анализа аминокислотного состава полученных пептидов приведены в табл. 3. Дополнительное подтверждение структуры синтезированных пептидов получено последовательным отщеплением нескольких аминокислотных остатков с N-конца каждого пептида методом Эдмана.

Конъюгаты пептидов с БСА получали с помощью бифункционального сшивающего агента SPDP — N-оксисукцинимидного эфира 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты [16], образующего ковалентную связь между SH-группами цистеина и  $\epsilon$ -аминогруппами лизина. Ацилируя БСА избытком SPDP, вводили 30–32 моль 3-(2-пиридилдитио)пропионильных остатков на 1 моль БСА. S-Ацетамидометильную группу с пептида удаляли ацетатом ртути(II) в водной  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , ионы  $\text{Hg}^{2+}$  осаждали сероводородом [11] и после удаления избытка  $\text{H}_2\text{S}$  пептид немедленно использовали для конъюгации. Конъюгацию пептидов с ацилированным БСА проводили в 7 М мочеvine, хорошо растворяющей и пептиды, и ацилированный БСА. Конъюгаты, полученные таким образом, содержали 22–28 моль пептида на 1 моль белка. Количество связанного пептида определяли по накоплению в растворе 2-тиониридола, по данным аминокислотного анализа и по включению радиоактивной метки в высокомолекулярный продукт, причем все методы анализа дали практически одинаковые значения.

В настоящее время изучаются антигенные и иммуногенные свойства полученных конъюгатов.

### Экспериментальная часть

В работе использовались *L*-аминокислоты (Reanal, Венгрия; Merck, ФРГ), Woc-Ser(Bzl) и Woc-Thr(Bzl) (Fluka, Швейцария), 4-диметиламинопиридин и DCC (Fluka), трифторметансульфокислота и дитиотреит (Merck), [ $^3\text{H}$ ]- и [ $^{14}\text{C}$ ]аминокислоты (Amersham, Англия), [ $^{14}\text{C}$ ]уксусный ангидрид производства В/О Изотоп.

В лаборатории синтезированы: Tyr(Bzl) [17], Cys(Асм) [11], Lys(Z) [18], Glu(Bzl) [14], Woc-Arg(Mts) [10], ди-*трет*-бутилширокарбонат [19], НОВТ [20], SPDP [16]; Woc-аминокислоты получали как описано в работе [21], активированные эфиры Woc-аминокислот — согласно [14].

Очистку растворителей проводили по обычным методикам [22]. Ацетонитрил для обращенно-фазовой хроматографии очищали перегонкой над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck) в системах: гексан — толуол, 4:1 (А); хлороформ — ацетон, 4:1, насыщена  $\text{H}_2\text{O}$  (Б); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 90:7:3 (В); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 70:16:8:6 (Г). Пятна обнару-

живали в видимом или УФ-свете, а также медь-нигидриновым или хлор-бензидиновым реактивами.

Аналитическую обращенно-фазовую хроматографию проводили на хроматографе Altex 332 (Altex, США) с УФ-детектором от микроколоночного хроматографа «Обь-4» (СССР) с использованием стальных колонок (2×250 мм), заполненных TMS-силикагелем, 10 мкм [15]. Вещества элюировали в градиенте концентрации ацетонитрила в воде (10→90%), содержащем 0,5% CF<sub>3</sub>COOH (рН 2,5), скорость элюции 1 мл/мин. Для препаративной хроматографии использовали стальные колонки (10×250 мм) с TMS-силикагелем (10 мкм) и стеклянные колонки (15×300 мм) с TMS-силикагелем (40–60 мкм), а также колонку (4×10 см) с силикагелем марки Kieselgel 60, 70–230 меш (Merck).

Анализ аминокислотного состава пептидов и конъюгатов после гидролиза препаратов 6 н. HCl (110°, 24 ч) в запаянных ампулах осуществляли на автоматическом аминокислотном анализаторе Biotronic LC-7000 (ФРГ).

УФ-спектры снимали на приборе Perkin—Elmer 550 (США). ИК-спектры записывали на AssuLab-8 (Beckman, США). Оптическое вращение измеряли на поляриметре DIP-4 (Jasco, Япония).

*Синтез 2-[4-(Фенилазо)бензилсульфонил]этанола (Pse-OH).*

*а. 4-Метилазобензол.* 8,7 г (90 ммоль) нитрозобензола и 8,7 г (90 ммоль) *n*-толуидина растворяли в 70 мл CH<sub>3</sub>COOH и выдерживали 1,5 ч при 50° С. Реакционную смесь выливали в 800 мл холодной воды при перемешивании, осадок отфильтровывали и промывали водой. Влажный продукт перекристаллизовали из 100 мл этанола. Выход 13,5 г (75%), т. пл. 67–68° С, *R<sub>f</sub>* 0,65 (А).

*б. 4-Бромметилазобензол.* 13,3 г (66 ммоль) 4-метилазобензола, 13 г (75 ммоль) *N*-бромсукцинимид и 0,2 г динитрила 2,2'-азодиизомасляной кислоты кипятили 5 ч в 200 мл сухого CCl<sub>4</sub>. По окончании реакции сукцинимид отфильтровывали, промывали CCl<sub>4</sub>, фильтрат упаривали. Кристаллический остаток суспендировали в 80 мл холодного этанола и отфильтровывали. Выход 16 г (85%), т. пл. 112–113° С, *R<sub>f</sub>* 0,50 (А).

*в. 2-[4-(Фенилазо)бензилтио]этанол.* К раствору 15,5 г (56 ммоль) 4-бромметилазобензола в 80 мл диоксана и 40 мл этанола добавляли раствор 5,1 г (68 ммоль) 2-меркаптоэтанола в 33 мл 2 н. NaOH. Гомогенную смесь оставляли на 18 ч при 18° С, затем упаривали до выпадения осадка. Смесь разбавляли 300 мл воды, осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили на воздухе. Сухой продукт промывали на фильтре 100 мл гексана для удаления следов 4-метилазобензола. Выход 13,9 г (90%), т. пл. 76–79° С, *R<sub>f</sub>* 0,1 (А), 0,78 (Б). УФ-спектр: λ<sub>max</sub> 326 нм (ε 2,50·10<sup>4</sup>), λ<sub>min</sub> 262 нм. Вычислено, %: С 66,18; Н 5,88; N 10,29; S 11,76. C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>ON<sub>2</sub>S. Найдено, %: С 66,50; Н 5,98; N 10,02; S 11,81.

*г. 2-[4-(Фенилазо)бензилсульфонил]этанол (Pse-OH).* К раствору 40,8 г (0,15 моль) 2-[4-(Фенилазо)бензилтио]этанола в 350 мл ацетона добавляли 45 мл 0,3 М водного раствора молибдата аммония, затем по каплям при перемешивании 50 мл 30% перекиси водорода. Смесь выдерживали 2 ч при 18° С, разбавляли равным объемом воды и охлаждали до 0° С. Осадок отфильтровывали и промывали на фильтре 1,5 л воды. Выход 36 г (79%), т. пл. 161–164° С (разл.). *R<sub>f</sub>* 0,40 (Б). ИК-спектр: 1130, 1290 см<sup>-1</sup> (S=O); 3200 см<sup>-1</sup> (O—H). УФ-спектр: λ<sub>max</sub> 322 нм (ε 2,30·10<sup>4</sup>), λ<sub>min</sub> 255 нм. Вычислено, %: С 59,21; Н 5,26; N 9,21; S 10,53. C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>S. Найдено, %: С 59,47; Н 5,43; N 9,14; S 10,42.

*Синтез Pse-эфиров Вос-аминокислот.* 15 ммоль Pse-OH и 17 ммоль соответствующей Вос-аминокислоты растворяли в 45 мл сухого пиридина, охлаждали до 0° С и добавляли 0,1 г 4-диметиламинопиридина и 16 ммоль DCC. Смесь выдерживали 16–18 ч при 5° С, затем при 18° С до исчезновения пятна Pse-OH на хроматограмме в системе Б. К смеси добавляли 100 мл этилацетата, отфильтровывали дициклогексилмочевину, осадок промывали этилацетатом. Фильтрат упаривали досуха, остаток упаривали с толуолом (2×50 мл), растворяли в 50 мл смеси этилацетат—хлороформ (1:1) и наносили на колонку (4×10 см) с сухим силикагелем. Продукт элюировали этилацетатом, элюат упаривали и остаток растирали с петро-

лейным эфиром. Выходы и характеристики Pse-эфиров Вос-аминокислот приведены в табл. 1. Все синтезированные эфиры имели удовлетворительные данные элементного анализа.

*Пентахлорфениловый эфир Вос-Arg(Mts)*. Раствор 4,67 г (10 ммоль) Вос-Arg(Mts) и 4,0 г (15 ммоль) пентахлорфенола в 20 мл сухого тетрагидрофурана охлаждали до 0° С и добавляли 2,06 г DCC. Смесь выдерживали 1 ч при 0° С и 1 ч при 18° С, затем выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали. Фильтрат упаривали, остаток растворяли в 30 мл смеси хлороформ — толуол (1:1) и наносили на колонку с сухим силикагелем (4×10 см). Колонку промывали хлороформом для удаления пентахлорфенола, продукт элюировали хлороформом, содержащим 7% этанола. Элюат упаривали и остаток растирали с гексаном. Выход 4,80 г (67%), т. пл. 37–38° С,  $[\alpha]_D^{25}$  –10,5° (с 5, этилацетат).

*Удаление Вос-защиты с Pse-эфиров аминокислот и пептидов*. Pse-Эфир соответствующей Вос-аминокислоты или пептида растворяли в охлажденной до 0° С безводной CF<sub>3</sub>COOH (10 мл на 1 г), выдерживали 5 мин и упаривали в вакууме при температуре бани не выше 20° С. Остаток растирали с сухим эфиром, промывали тремя порциями эфира и сушили в вакууме. В случае тирозин- и триптофансодержащих пептидов к CF<sub>3</sub>COOH добавляли 5% анизол и 3% трифенилфосфина.

*Наращивание пептидной цепи активированными эфирами Вос-аминокислот*. К 0,1–0,2 М раствору трифторацетата Pse-эфира аминоконпонента в сухом пиридине или DMF добавляли 2 экв. НОВТ, 2 экв. N-метилморфолина и 1,2–2 экв. активированного эфира Вос-аминокислоты. Смесь выдерживали 2–6 ч при 18° С, контролируя полноту ацилирования (см. ниже), затем упаривали в вакууме. Остаток при охлаждении тщательно растирали с водой, промывали водой на фильтре, сушили, промывали двумя-тремя порциями холодного изопропанола и несколькими порциями эфира. Если чистота продукта была недостаточной, его растворяли в ацетоне или DMF и переосаждали 5–6 объемами эфира.

*Анализ полноты ацилирования аминоконпонента*. Для пептидов, растворимых в хроматографических системах, полноту ацилирования анализировали тонкослойной хроматографией в системах Б, В или Г. В случае малорастворимых пептидов аликвоту реакционной смеси (15–25 мкл) обрабатывали 1 мл эфира в центрифужной пробирке, осадок отделяли центрифугированием, промывали 2–3 раза эфиром. Далее содержание первичных аминогрупп в осадке определяли по методике, описанной в работе [13].

*Удаление Pse-группы с защищенных Вос-пептидов*. Pse-Эфир соответствующего Вос-пептида растворяли в ацетоне или DMF (15 мл/г), охлаждали раствор в ледяной бане и добавляли по каплям при перемешивании 1,2 экв. 0,1 н. NaOH в 50% водном DMF в течение 15 мин. Смесь перемешивали еще 15 мин без охлаждения, нейтрализовали избытком CH<sub>3</sub>COOH и упаривали в вакууме. К остатку добавляли 100 мл этилацетата и 100 мл 3% водного раствора лимонной кислоты. Водный слой отделяли, органический слой промывали водой (2×100 мл), сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и наносили на колонку (4×10 см) с силикагелем, уравновешенным этилацетатом. Колонку отмывали от оранжевого красителя смесью этилацетата и ацетона (9:1), затем элюировали Вос-пептид смесью этилацетат — ацетон — CH<sub>3</sub>COOH (4:1:0,5). Элюат упаривали досуха, остаток осаждали из этилацетата петролейным эфиром. Выход Вос-Thr(Bzl)-Trp-Thr(Bzl)-Gly-OH 89%,  $R_f$  0,35 (Г), Вос-Thr(Bzl)-Glu(Bzl)-Gly-OH 42%,  $R_f$  0,56 (Г), Вос-Cys(Acm)-Lys(Z)-Arg(Mts)-Gly-OH 76%,  $R_f$  0,25 (Г). Пептиды гомогенны по данным ТСХ. Чистота по данным аналитической обращенно-фазовой хроматографии 94, 96 и 98% соответственно.

*Конденсация пептидных фрагментов*. 1,2 ммоль Вос-пептида со свободной концевой карбоксильной группой и 4,8 ммоль НОВТ растворяли в 5 мл DMF, охлаждали до 0° С и добавляли 1,4 ммоль DCC. Охлаждающую баню убирали и смесь выдерживали 30 мин. Дициклогексилмочевину отфильтровывали, промывали 3 мл DMF. Объединенные фильтраты добавляли к раствору 1 ммоль трифторацетата Pse-эфира пептида и 1,2 ммоль N-метилмор-



фоллина в 5 мл DMF и перемешивали 16–20 ч при 18° С. Полноту ацилирования аминокомпонента контролировали пингидриновым методом, как описано выше. Выделение целевых пептидов проводили так же, как и при синтезе методом активированных эфиров. Выходы Boc-Thr(Bzl)-Trp-Thr(Bzl)-Gly-Val-Thr(Bzl)-Gln-Asn-Cys(Acm)-OPse (схема 2), Boc-Thr(Bzl)-Glu(Bzl)-Gly-Phe-Thr(Bzl)-Trp-Thr(Bzl)-Gly-Val-Thr(Bzl)-Gln-Asn-Cys(Acm)-OPse (схема 2), Boc-Cys(Acm)-Lys(Z)-Arg(Mts)-Gly-Pro-Gly-Ser(Bzl)-Gly-Phe-OPse (схема 3) составили 97, 88 и 89% соответственно.

*Деблокирование пептидов.* С защищенного пептида удаляли Boc-защиту, как описано выше, полученный трифторацетат Pse-эфира пептида растворяли в DMF (15 мл/г) и добавляли при 0° С 3 экв. 0,1 н. Ва(ОН)<sub>2</sub> в 50% водном DMF. Через 20 мин раствор насыщали газообразным СО<sub>2</sub>, осадок карбоната бария удаляли центрифугированием и раствор упаривали. Остаток растирали с этилацетатом (20 мл), добавляли 50 мл эфира и центрифугировали. Осадок растворяли в минимальном объеме ледяной СН<sub>3</sub>СООН, переосаждали эфиром и сушили в вакууме. Частично деблокированный пептид растворяли в охлажденной до 0° С смеси CF<sub>3</sub>СООН — тиоанизола (9:1), добавляли трифторметансульфокислоту до концентрации 0,8–1,0 М (3–5-кратный избыток на каждую удаляемую защитную группу) и выдерживали 1,5 ч при 0° С. Раствор разбавляли 10-кратным объемом охлажденного эфира. Осадок отделяли центрифугированием, промывали двумя порциями эфира, затем переосаждали из СН<sub>3</sub>СООН эфиром, снова промывали двумя порциями эфира и сушили в вакууме.

#### *Очистка деблокированных пептидов*

*Пептид 122–133.* Деблокированный тридекапептид, полученный из 300 мг защищенного, растворяли в 20 мл 7 М мочевины и после удаления небольшого количества нерастворимого материала центрифугированием хроматографировали на колонке с TMS-силикагелем (рис. 1а). После лиофилизации выход пептида 27 мг (14%); удельная радиоактивность 2·10<sup>5</sup> имп/мин·мкмоль; содержание основного вещества, по данным ВЭЖХ, 96%.

*Пептид 136–147.* Деблокированный пептид, полученный из 620 мг защищенного, растворяли в 10 мл 0,1 М раствора ацетата аммония и хроматографировали на колонке с TMS-силикагелем (рис. 2). Фракции, содержащие целевой додекапептид, лиофилизовали. Выход 140 мг (33%), содержание основного вещества, по данным ВЭЖХ, 97%.

*Пептид [<sup>14</sup>C]Ac-(136–147).* С 300 мг защищенного пептида 136–147 удаляли Boc-защиту и ацетилировали полученный трифторацетат 2 экв. [<sup>14</sup>C]уксусного ангидрида в 2 мл DMF в присутствии 2 экв. НОВТ и 2 экв. N-метилморфолина. После удаления Pse-защиты пептид деблокировали трифторметансульфокислотой, как описано выше. Деблокированный [<sup>14</sup>C]ацетилдодекапептид растворяли в 2 мл 0,1 М ацетата аммония, хроматографировали на TMS-силикагеле, как описано для пептида 136–147. Выход 60 мг (30%); удельная радиоактивность 3,3·10<sup>5</sup> имп/мин·мкмоль.

*Пептид (154–164)-1.* Деблокированный пептид, полученный из 200 мг защищенного, растворяли в 10 мл 10% водной СН<sub>3</sub>СООН и хроматографировали на колонке с TMS-силикагелем (рис. 1б). Выход 98 мг (64%), содержание основного вещества, по данным ВЭЖХ, 99%; удельная радиоактивность 2,2·10<sup>5</sup> имп/мин·мкмоль.

*Пептид (154–164)-2.* Из 500 мг защищенного пептида аналогично пептиду (154–164)-1 получено 158 мг (45%) чистого пептида (154–164)-2 (рис. 1в). Содержание основного вещества, по данным ВЭЖХ, 98%; удельная радиоактивность 2,3·10<sup>5</sup> имп/мин·мкмоль.

Аминокислотный состав синтезированных пептидов приведен в табл. 3.

*Удаление Аст-защитных групп с пептидов.* 10 мкмоль пептида растворяли в 1 мл дегазированной 50% СН<sub>3</sub>СООН и добавляли 50 мкл свежеприготовленного водного 1 М раствора ацетата ртути (II). Выдерживали 2 ч при 18° С и смесь насыщали газообразным сероводородом. Осадок HgS

удаляли центрифугированием, промывали его 1 мл дегазированной воды. Раствор упаривали в вакууме, к остатку добавляли воду и упаривали для удаления следов  $H_2S$ , полученное вещество немедленно использовали для конъюгирования с БСА.

*Ацилирование БСА SPDP.* 50 мг БСА растворяли в 1,2 мл 0,1 М N-метилморфолин-ацетатного буфера (рН 7,3), к раствору при перемешивании добавляли порциями по 0,1 мл раствор 20 мг SPDP в 0,6 мл тетрагидрофурана. Выдерживали 2 ч при 18°С, упаривали тетрагидрофуран и остаток диализовали против 0,03% водного аммиака. После лиофилизации определяли количество 2-пиридилтиогрупп в препарате, обрабатывая навеску ацилированного БСА 0,1% водным раствором дитиотрепта и измеряя количество образовавшегося 2-тиопиридона спектрофотометрически при  $\lambda$  343 нм ( $\epsilon$   $8,08 \cdot 10^3$  М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> [12]). Полученные препараты ацилированного БСА содержали 32–40 моль 2-пиридилтиогрупп на 1 моль БСА.

*Конъюгирование пептидов с БСА.* 15 мг БСА, ацилированного SPDP (7,5 мкмоль 2-пиридилтиогрупп), растворяли в 5 мл 7 М мочевины, через раствор барботировали аргон, затем добавляли раствор 10 мкмоль пептида со свободной SH-группой в 0,5 мл 50%  $CH_3COOH$ . Смесь перемешивали 16 ч при 18°С. За ходом реакции следили по накоплению в растворе 2-тиопиридона. По окончании реакции смесь диализовали против воды, содержащей 0,03% аммиака, и лиофилизовали. Степень конъюгации, определенная по накоплению 2-тиопиридона, по данным аминокислотного анализа и по включению радиоактивной метки в высокомолекулярный продукт, составляла 22–28 моль пептида на 1 моль белка.

Авторы выражают благодарность А. М. Ерошкину за рекомендации по выбору аминокислотных последовательностей для синтеза, В. В. Шапову за анализы аминокислотного состава препаратов, З. А. Акименко за секвенирование пептидов по Эдману, а также Н. И. Радаевой, И. Н. Никоновой, Е. Н. Собяниной за помощь в работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Arnon R., Sela M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, v. 68, № 3, p. 1450–1455.
2. Arnon R. Ann. Rev. Microbiol., 1980, v. 34, p. 593–618.
3. Beale J. Nature, 1982, v. 298, p. 14–15.
4. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. Nature, 1982, v. 298, p. 30–33.
5. Müller G. M., Shapira M., Arnon R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 1, p. 569–573.
6. Audibert F., Jolivet M., Chedid L., Arnon R., Sela M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 8, p. 5042–5046.
7. Webster R. G., Laver W. G., Air G. M., Schild G. C. Nature, 1982, v. 296, p. 115–121.
8. Wilson I. A., Skehel J. J., Wiley D. C. Nature, 1981, v. 289, p. 366–373.
9. Diaz J., Guegan R., Beaumont M., Benoit J., Clement J., Fauchard O., Galtier D., Millon J., Muneaux C., Muneaux J., Vedel M., Schwyzer R. Bioorg. Chem., 1979, v. 8, № 4, p. 429–442.
10. Yajima H., Takeyama M., Kanaki J., Mitahi K. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1978, № 11, p. 482–483.
11. Veber D. F., Milkowski J. D., Varga S. L., Denkwalter R. G., Hirschmann R. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 15, p. 5456–5461.
12. Kaiser E. T., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I. Anal. Biochem., 1970, v. 34, № 2, p. 595–598.
13. Sarin V. K., Kent S. B. H., Merrifield R. B. Anal. Biochem., 1981, v. 117, № 1, p. 147–157.
14. Wünsch E. Synthese von Peptiden. B. 1, 2. In: Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie/Ed. Müller E. Stuttgart: Thieme, 1977.
15. Калашников В. В., Самуков В. В., Ямщиков В. Ф., Шубина Т. Н. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 666–672.
16. Carlsson J., Drevin H., Axen R. Biochem. J., 1978, v. 173, № 2, p. 723–737.
17. Wünsch E., Fries G., Zwick A. Chem. Ber., 1958, B. 91, № 3, S. 542–547.
18. Kjaer A., Larsen P. O. Acta chem. scand., 1961, v. 15, № 4, p. 750–759.
19. Позднеев В. Ф., Смирнова Е. А., Подгорнова Н. Н., Зенцова Н. К., Калей У. О. Журн. орган. химии, 1979, т. 15, № 1, с. 106–109.
20. Brady O. L., Reynolds C. L. J. Chem. Soc., 1928, № 1, p. 193–202.
21. Позднеев В. Ф. Химия природных соединений, 1974, № 6, с. 764–767.
22. Гордон А., Форд Р. В кн.: Спутник химика. М.: Мир, 1976, с. 437–446.

Поступила в редакцию  
8.I.1985

**SYNTHESIS OF PEPTIDE FRAGMENTS OF HEMAGGLUTININ OF THE  
A/Aichi/2/68 (H3N2) INFLUENZA VIRUS**

**SAMUKOV V. V., KALASHNIKOV V. V., OFITSEROV V. I., SHVALIE A. F.**

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk  
Region*

Peptides corresponding to sequences 122-133, 136-147, and 154-164 of the heavy chain of hemagglutinin of the A/Aichi/2/68 (H3N2) influenza virus have been synthesized by stepwise elongation of the peptide chain with Boc-amino acid activated esters or by condensation of peptide blocks by DCC/HOBt-method. A coloured C-protecting group, 2-[4-(phenylazo)-benzylsulfonyl]ethyl (PSE), was used, which is convenient in purification of synthetic peptides. After removal of terminal N- and C-protecting groups the side-protecting residues were cleaved off with 1 M trifluoromethanesulfonic acid in trifluoroacetic acid containing 10% thioanisole. Crude products were purified by preparative reversed-phase liquid chromatography. Synthesized peptides were conjugated with BSA.