



УДК 577.412.6.083.3

СИНТЕЗ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДОВ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 59—72
И 25—36 ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА

Оптриненко Л. В., Михалева И. И., Дунзв В. Е.,
Несмеянов В. А., Иванов В. Т.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Получены пептиды последовательности 59—72 и 25—36 интерлейкина-2 (IL-2) человека. Пептид последовательности 59—72 был выбран как один из иммуногенных в молекуле белка и синтезирован с целью получения антител для выделения и очистки рекомбинантного IL-2. Установлено, что эпитоп находится в С-концевом районе указанного пептида. Пептид последовательности 25—36 IL-2 был выбран в качестве потенциального эпитопа на основе расчета вторичной структуры и профиля гидрофильности. Оба пептида были синтезированы классическими методами пептидного синтеза в растворе и конъюгированы с белком-носителем с целью получения поликлональных антител. Полученные антитела связываются с IL-2 в твердофазном ИФА. Кроме того, моноклональные антитела к IL-2 связываются в ИФА с пептидом 59—72, что дает возможность охарактеризовать эпитоп, находящийся в этом районе, как основной в молекуле белка.

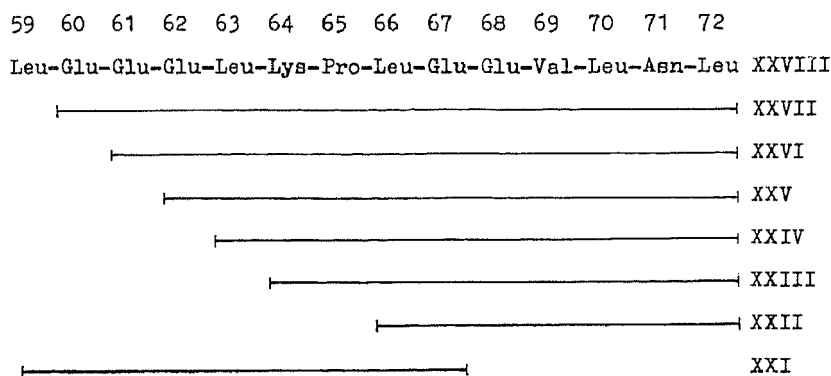
Благодаря широкому спектру биологического действия и возможности применения в медицине интерлейкин-2 (IL-2), или Т-клеточный ростовой фактор, в последнее время стал объектом детального изучения. Исследования биологической роли этого белка сопряжены с такими важнейшими проблемами, как клеточный рост и дифференциация, регуляция иммунного ответа, механизм возникновения иммунодефицитных состояний.

В связи с большой актуальностью изучения этого лимфокина IL-2 и часть проводимых в институте иммунохимических исследований IL-2 и работ по созданию диагностического набора нами было предпринято его антигенно-функциональное изучение. С этой целью мы осуществили синтез ряда пептидов — фрагментов IL-2 человека — и исследовали их иммунохимические свойства.

На основе анализа профиля гидрофильности и расчета вторичной структуры [1, 2], а также литературных данных об антигенной структуре белка [3—7] для химического синтеза были выбраны пептиды последовательности 59—72 и 25—36 IL-2 человека. Пептид участка последовательности 59—72 уже был исследован ранее Альтманом с сотр. [3], которые получили на его основе антипептидные антитела, способные связываться с IL-2. Для более точной локализации антигенного участка в этом районе молекулы лимфокина мы сочли целесообразным синтезировать именно этот пептид и ряд его укороченных с N- и С-конца производных: 60—72 (XXVII), 61—72 (XXVI), 62—72 (XXV), 63—72 (XXIV), 64—72 (XXIII), 66—72 (XXII), 59—67 (XXI).

Синтез пептидов был осуществлен классическими методами пептидного синтеза в растворе с использованием тактики максимальной защиты полифункциональных аминокислот.

В работе использованы стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC — IUB, а также: EDAC — хлоргидрат 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, HOBT — 1-гидроксбензотриазол, IL-2 — интерлейкин-2, KLN — гемоцианин моллюска *фиссуреллы*, NEM — N-этилморфолин, NMM — N-метилморфолин, ONb — *n*-нитробензилокси-, ONp — *n*-нитрофенилокси-, OPir — 2,3,4,5,6-пентафторфенилокси-, TFA — трифторуксусная кислота, TFE — трифторэтанол, ИФА — иммуноферментный анализ.



Пептиды (XIII) (схема 1) и (XXXIX) (схема 2) были получены конденсацией фрагментов, выбранных таким образом, чтобы активация проходила по остаткам оптически неактивного глицина и практически не рацемизирующегося в ходе реакции конденсации пролина. Фрагменты (VI), (XII), (XXXVII), (XXXVIII), (XXXV) были синтезированы ступенчатым наращиванием цепи с С-конца.

В процессе синтеза в качестве временной защитной группировки для N^α-аминогрупп применяли Вос-группу, для защиты боковых функций использовали защитные группы бензильного типа: для лизина — Z, для тирозина — Bzl, для глутаминовой кислоты — OBzl; амидную функцию аспарагина оставили незащищенной. Карбоксильные группы лейцина-72, лейцина-36, глицина-27 блокировали переводом в *n*-нитробензиловые эфиры, что улучшало растворимость пептидов, облегчало их кристаллизацию и детекцию при хроматографии по поглощению в УФ-области. Карбоксильные группы остальных С-концевых аминокислот при проведении реакций ступенчатого наращивания цепи защищали солеобразованием. Для удаления Вос-группы на промежуточных стадиях синтеза использовали смесь TFA — AcOH (7 : 3). В этих условиях практически не наблюдалось побочных реакций отщепления Z-группы с ε-NH₂-функции лизина и Bzl-группы с фенольного гидроксидом тирозина.

В ходе синтеза фрагментов при наращивании пептидной цепи наиболее часто использовали *n*-нитрофениловые эфиры, аминолиз которых катализировали HOBt. Для введения остатков лизина применяли Вос-Lys(Z)-OSu (в случае пептида VII) или Вос-Lys(Z)-OPfp (в случае пептида XXXV).

Конденсации проводили с помощью DCC/HOBt- или EDAC/HOBt-метода. Для выделения сравнительно коротких пептидов использовали колоночную хроматографию на силасорбе 600 в градиенте растворителей EtOAc — EtOH.

Индивидуальность пептидов контролировали ТСХ на пластинках с силикагелем в нескольких хроматографических системах, а также аминокислотным анализом.

Пептиды, полученные блочной конденсацией фрагментов, выделяли гель-фильтрацией на сефадексах LH-20, LH-60, на TSK-геле HW-40 (Toyo-pearl).

Рассмотрим ход синтеза. Защищенный тетрадекапептид (XIII) получали из *n*-нитробензильного эфира лейцина (схема 1).

Дипептид (I) получали с помощью «комплекса F» (DCC+3 экв. PfpOH), в дальнейшем ступенчатое наращивание цепи вплоть до гептапептида (VI) вели методами активированных эфиров. Низкая растворимость защищенных пептидов (II)—(VI) и их склонность к образованию гелеобразных осадков затрудняли выделение пептидов кристаллизацией, однако соединения удавалось очистить промывками этилацетатом и метанолом.

Дипептид (VII) получали из Вос-Lys(Z)-OSu, в дальнейшем последовательное наращивание цепи вели методом *n*-нитрофениловых эфиров в присутствии HOBt, причем использовали избытки *n*-нитрофениловых эфиров на каждой стадии синтеза, что обеспечивало достаточно высокие

Глума I

[illegible]

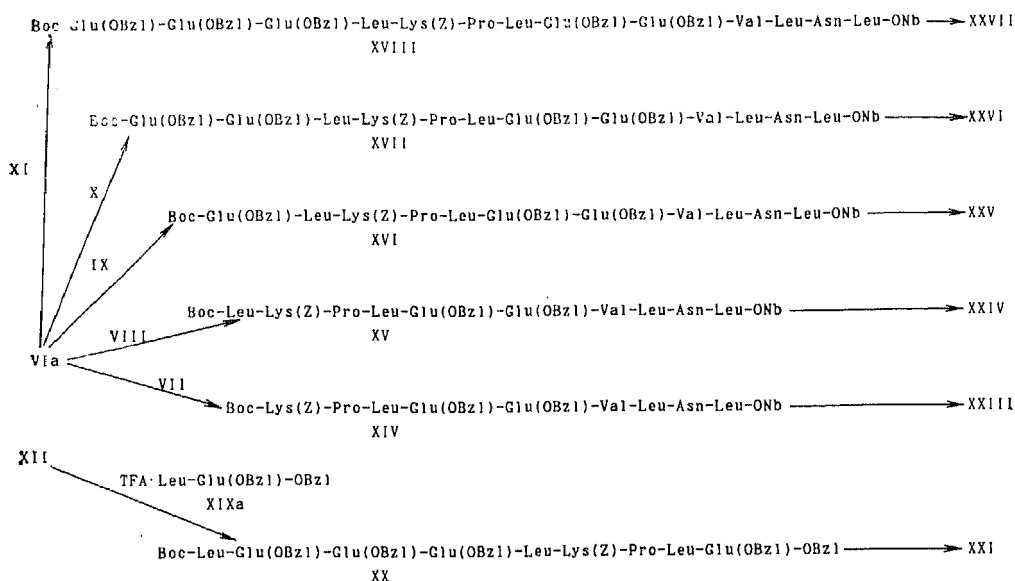
Синтез пептида (XXVIII) последовательности 59—72 интерлейкина-2 человека

Схема 2

[illegible]

Синтез пептида (XL) последовательности 25—36 интерлейкина-2 человека

выходы пептидов (до 85 %). Однако выделение и очистка пептидов (VII) — (XII) часто осложнялись их слабой способностью к кристаллизации и высокой растворимостью во многих органических растворителях. В результате пептиды выделяли колоночной хроматографией на силасорбе 600 в градиенте растворителей этилацетат — этанол.



Синтез фрагментов пептида последовательности 59—72 интерлейкина-2 человека

Защищенный тетрадекапептид (XIII) получали конденсацией двух семичленных фрагментов DCC/NOBt-методом. Конечный продукт выделяли гель-фильтрацией на сефадексе LH-60 в DMF с 10% AcOH. Деблокирование пептида (XIII) осуществляли в две стадии: 1) каталитическим гидрогенолизом над Pd/C; 2) обработкой HBr/TFA, так как удалить все боковые защитные группы каталитическим гидрогенолизом не удалось. Свободный пептид (XXVIII) выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-15 в 10% AcOH.

Пептид (XXXIX) последовательности 25—36 IL-2 получали по схеме 2. Разбивка на фрагменты (3+7+2) осуществлялась таким образом, чтобы снизить риск частичного отщепления Z-группы с ϵ -NH₂-функции лизина в условиях многократного удаления Boc-группы.

Фрагменты (XXXVII), (XXXIV), (XXXV) получали ступенчатым наращиванием цепи методами активированных эфиров. В ходе синтеза фрагмента (XXXIV) C-концевой остаток пролина защищали солеобразованием, причем реакции вели в пиридине, так как пептиды плохо растворялись в других органических растворителях, таких, как диоксан, тетрагидрофуран, DMF.

Пептид (XXXVIII) получали конденсацией двух фрагментов (7+2), реакцию проводили с использованием избытка дипептида (XXXVa). В случае применения DCC/NOBt выход составил всего 42%, в то время как замена DCC на EDAC повысила выход до 82%. Нонапептид (XXXVIII) выделяли гель-фильтрацией на TSK-геле HW-40 в DMF с 10% AcOH.

Защищенный додекапептид (XXXIX) деблокировали обработкой AcOH — TFA (3:7) и каталитическим гидрогенолизом над Pd/C (10%) в токе H₂ в течение 2 ч. Получен свободный пептид (XL).

Укороченные пептиды (XXI)—(XXVIII) синтезировали по схеме 3.

Пептиды (XXVIII) и (XL) конъюгировали с KLN с помощью глутарового альдегида. Иммунизацию кроликов проводили, вводя по 200—300 мкг конъюгатов подкожно с интервалом в 2 нед, причем первую иммунизацию — в смеси с полным адъювантом Фрейнда, а вторую и третью — в неполном. Через 10 сут после третьей иммунизации брали кровь и определяли титр антител в антисыворотке методом твердофазного ИФА. Для этого пептиды или IL-2 сорбировали на пластиковые платы и после инкубации с образцами антисыворотки комплекс антиген—антитело детектировали с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антител к иммуноглобулинам кролика или кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши. Титр антител против тетрадекапептида (XXVIII) составил

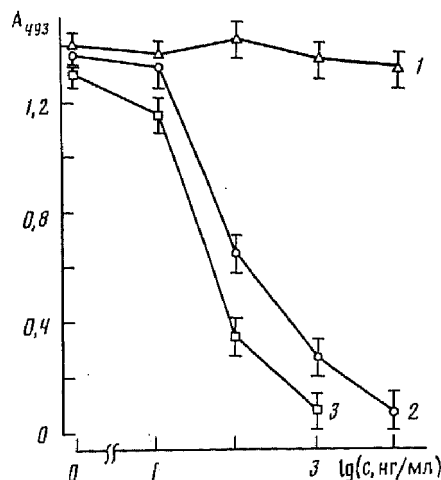


Рис. 1

Рис. 1. Ингибирование связывания поликлональных кроличьих антител с интерлейкином-2: пептидом (XXI) — 1, (XXII) — 2, (XXVIII) — 3

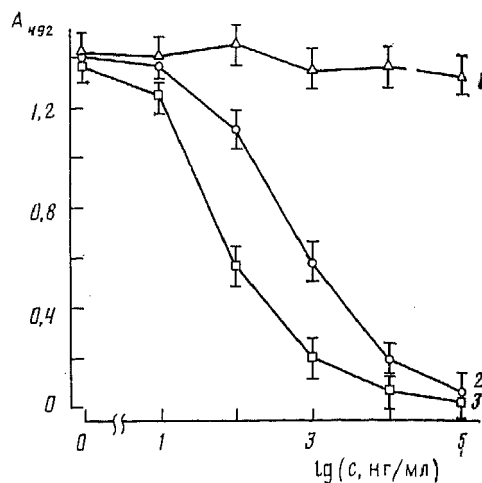


Рис. 2

Рис. 2. Ингибирование связывания моноклональных антител с интерлейкином-2: пептидом (XXI) — 1, (XXII) — 2, (XXVIII) — 3

1 : 10 000, а против додекапептида (XL) — 1 : 500 в твердофазном ИФА. Антитела были очищены аффинной хроматографией на колонке с пептидом (XXVIII), иммобилизованным на BrCN-сефарозе 4В.

Антитела к пептидам взаимодействовали с рекомбинантным IL-2 в твердофазном ИФА (рис. 1, 2). В случае пептида (XXVIII) была проведена более точная локализация эпитопа, вызывающего образование антител. Способность аффинно очищенных поликлональных антител связываться с укороченными с N- и С-конца фрагментами пептида (XXVIII) изучали с помощью ИФА в варианте конкуренции с IL-2, иммобилизованным на планшете, за связывание с антителами. Установлено, что укороченные с N-конца фрагменты тетрадекапептида способны связываться с антителами вплоть до фрагмента 64—72 (XXII), тогда как пептид (XXI), укороченный с С-конца, утрачивал эту способность. На рис. 1 представлены кривые (1—3) ингибирования связывания поликлональных кроличьих антител с IL-2 пептидами (XXVIII), (XXII), (XXI). Для пептидов (XXIII), (XXIV), (XXV), (XXVII) они не приведены, поскольку занимают промежуточное положение между кривыми 1 и 2 и существенно от них не отличаются.

Среди набора гибридом, полученных нами к рекомбинантному IL-2, был идентифицирован клон, продуцирующий моноклональные антитела, реагирующие с IL-2 и пептидом (XXVIII) [8]. Исследования по ингибированию связывания этих антител с IL-2, пептидом (XXVIII) и его укороченными фрагментами дали результаты, аналогичные полученным для поликлональных кроличьих антител (см. рис. 2).

Таким образом, вышеприведенные данные позволяют сделать вывод: эпитоп локализован на С-концевом участке пептида (XXVIII) и относится к числу основных эпитопов в молекуле IL-2 человека.

Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты и их производные (Reanal, Serva). ТСХ осуществляли на пластинках с закрепленным слоем силикагеля фирмы Merck в следующих хроматографических системах: хлороформ — этанол, 10:1 (А), хлороформ — этанол — уксусная кислота, 10:1:0,2 (Б), хлороформ — этилацетат — метанол — уксусная кислота, 9:3:2:1 (В), хлороформ — трифторэтанол — уксусная кислота, 15:11:0,1 (Г), толуол — уксусная кислота, 7:3 (Д), бутанол — уксусная кислота — вода, 12:3:5 (Е), изопропанол — вода, 2:1 (Ж), метанол — вода — ацетат натрия,

Константы полученных соединений

Пептид	Т. пл., °C	$[\alpha]_D$ (с, TFE)	R_f (система)
I	192—194	—20,9 (1,0)	0,64 (Б), 0,41 (Д)
II	188—189	—29,1 (1,0)	0,66 (Б), 0,43 (Д)
III	230—231	—37,3 (1,3)	0,63 (Б), 0,39 (Д)
IV	243—244	—34,6 (0,3)	0,61 (Б), 0,39 (Д)
V	268—271 (разл.)	—23,5 (0,2)	0,58 (Б), 0,35 (Д)
VI	237—238	—36,6 (1,0)	0,55 (Б), 0,32 (Д)
VII	Масло	—40,2 (1,1)	0,59 (А), 0,49 (Д)
VIII	»	—51,0 (1,0)	0,51 (А), 0,46 (Д)
IX	»	—42,3 (0,7)	0,47 (А), 0,44 (Д)
X	83—84	—46,8 (1,5)	0,50 (А), 0,37 (Д)
XI	86—88	—47,4 (0,9)	0,53 (А), 0,31 (Д)
XII	237—238	—33,3 (1,3)	0,48 (А), 0,29 (Д)
XIII	211—213	—13,2 (0,3)	0,56 (Б), 0,61 (Г)
XIV	219—220	—10,6 (0,2)	0,34 (К), 0,80 (Г)
XV	214—215	—8,7 (0,2)	0,60 (Б), 0,76 (Г)
XVI	210—212	—11,2 (0,4)	0,63 (Б), 0,56 (Д)
XVII	209—211	—21,9 (0,8)	0,60 (Б), 0,55 (Д)
XVIII	223—225	—24,8 (1,0)	0,64 (Г), 0,30 (К)
XIX	76—78	—4,4 (1,0)	0,87 (А), 0,73 (Д)
XX	198—200	—22,4 (0,9)	0,77 (Б), 0,60 (Д)
XXI	Аморфное	—57,8 (0,2) *	0,30 (Е), 0,45 (Ж)
XXII	»	—67,6 (0,3) *	0,38 (Е), 0,47 (Ж)
XXIII	»	—68,7 (0,5) *	0,36 (Е), 0,49 (Ж)
XXIV	»	—69,1 (0,2) *	0,35 (Е), 0,43 (Ж)
XXV	»	—70,2 (0,3) *	0,33 (Е), 0,46 (Ж)
XXVI	»	—62,8 (0,8) *	0,32 (Е), 0,50 (Ж)
XXVII	»	—69,4 (0,2)	0,36 (Е), 0,52 (Ж)
XXVIII	»	—71,2 (0,5)	0,24 (Е), 0,42 (Ж)
XXIX	Масло	—17,8 (0,4)	0,24 (Д), 0,55 (Б)
XXX	98—99	—19,4 (0,5)	0,20 (Д), 0,42 (Б)
XXXI	100—102	—22,3 (0,5)	0,29 (Д), 0,37 (Б)
XXXII	188—189	—30,1 (0,8)	0,78 (З), 0,80 (И)
XXXIII	192—193	—39,2 (0,8)	0,63 (З), 0,85 (И)
XXXIV	219—220	—48,6 (0,4)	0,61 (Г), 0,45 (Б)
XXXV	83—85	—24,9 (0,5)	0,76 (Д), 0,84 (Б)
XXXVI	79—81	—8,3 (0,5)	0,61 (Б), 0,27 (Д)
XXXVII	154—155	—12,8 (0,7)	0,32 (Д), 0,70 (Б)
XXXVIII	206—207	—45,8 (1,0)	0,78 (Е), 0,85 (З)
XXXIX	Аморфное	—51,3 (1,1)	0,68 (Е), 0,79 (З)
XL	»	—58,3 (1,2)	0,09 (Е), 0,52 (Л)

* В воде.

95:5:1,5 г на 100 мл системы (З), диоксан — вода — аммиак, 8:1,5:1,3 (И), хлороформ — трифторэтанол, 5:1 (К), бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин, 4:1:1:1 (Л).

Для колоночной хроматографии использовали силикагель L 40/100 мкм (Chemapol, ЧССР), силасорб 600 LC 200 мкм (Chemapol, ЧССР), сефадексы LH-20, LH-60 в DMF с 10% AcOH, G-15 в 0,1 н. AcOH (Pharmacia, Швеция), TSK-гель Тоуо-pearl HW-40 в DMF с 10% AcOH (Тоуо-soda, Япония). В качестве детектирующих приборов применяли Uvicord II, Uvicord SD (LKB, Швеция). Физико-химические константы соединений приведены в таблице. Удельное вращение измеряли на поляриметре Jasko DIP-360 (Jasko, Япония). Температуру плавления определяли на приборе Boetius (ГДР), все приведенные точки плавления не исправлены. Количественный аминокислотный анализ осуществляли на приборе D-500, (Durrum, США), пептиды гидролизovali стандартным образом (6 н. HCl, 24 ч, 100° C).

Для конъюгации использовали KLN (Calbiochem, США) и раствор глутарового альдегида (Serva, ФРГ). ИФА проводили в планшетах Nunc (Дания), иммунный комплекс выявляли с помощью козьих антител к иммуноглобулинам кролика или кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США). В качестве

субстрата использовали *o*-фенилендиамин (Sigma, США), интенсивность окраски измеряли с помощью Multiscan (Flow, Великобритания). Все растворители предварительно перегоняли. Растворители, применявшиеся для проведения реакций конденсации, абсолютировали обычным образом [9].

1. *Boc-Asn-Leu-ONb (I)*. Суспензию 20,0 г (86,1 ммоль) *Boc-Asn* и 29,8 г (85,8 ммоль) *HBr·Leu-ONb* в 50 мл DMF охлаждали до -30°C и добавляли при перемешивании охлажденный до -5°C раствор 17,7 г (85,9 ммоль) DCC и 47,4 г (258,0 ммоль) *PfpOH* в 50 мл DMF и 8,8 мл (80,1 ммоль) NMM. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -30°C , 3 ч при -15°C и 12 ч при 25°C , дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток промывали хлороформом (3×200 мл) и высушивали под вакуумом. Выход дипептида (I) 28,0 г (68%). Аминокислотный анализ: Leu 1,0 (1), Asp 1,0 (1).

2. *Boc-Leu-Asn-Leu-ONb (II)*. Раствор 24,0 г (50,0 ммоль) дипептида (I) в 100 мл TFA выдерживали 30 мин при 25°C , упаривали, остаток промывали абс. эфиром, высушивали под вакуумом. Выход трифторацетата (IIa) 23,1 г (93%).

К раствору 23,1 г (46,6 ммоль) трифторацетата (IIa) в 40 мл DMF прибавляли 5,1 мл (46,6 ммоль) NMM и после охлаждения раствора до 5°C 19,0 г (58,0 ммоль) *Boc-Leu-OSu* при перемешивании. Смесь перемешивали 30 мин при 5°C и 20 ч при 25°C , растворитель упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали 5% NaHSO_4 (3×100 мл), водой. Этилацетатный слой высушивали над Na_2SO_4 и упаривали. Образовавшиеся кристаллы высушивали под вакуумом. Выход трипептида (II) 25,9 г (95%). Аминокислотный анализ: Leu 2,1 (2), Asp 1,0 (1).

3. *Boc-Val-Leu-Asn-Leu-ONb (III)*. Раствор 25,9 г (43,7 ммоль) трипептида (II) в 100 мл TFA выдерживали 1,5 ч при 25°C , упаривали, остаток кристаллизовали из смеси эфир — пентан (3:1), высушивали под вакуумом. Выход трифторацетата (IIIa) 26,0 г (98%).

К раствору 26,0 г (42,8 ммоль) трифторацетата (IIIa) в 40 мл DMF прибавляли 4,7 мл (42,8 ммоль) NMM и после охлаждения раствора до 5°C 15,7 г (50,0 ммоль) *Boc-Val-OSu*. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 5°C и 20 ч при 25°C , растворитель упаривали, остаток растворяли в DMF, содержащем 10% воды, пропускали через ионообменную смолу дауэкс 50×8 (300—400 меш, H^+ -форма). Раствор упаривали, остаток высушивали под вакуумом над P_2O_5 , кристаллизовали из эфира, многократно промывали смесью эфир — хлороформ (2:1), высушивали в вакууме. Выход тетрапептида (III) 15,7 г (53%). Аминокислотный анализ: Val 0,98 (1,00), Leu 2,10 (2), Asp 1,00 (1).

4. *Boc-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-ONb (IV)*. Раствор 10,0 г (14,4 ммоль) тетрапептида (III) в 100 мл TFA выдерживали 1,5 ч при 25°C , упаривали, остаток кристаллизовали из эфира, высушивали под вакуумом. Выход трифторацетата (IIIa) 10,2 г (количественный).

К раствору 10,2 г (14,4 ммоль) трифторацетата (IIIa) в смеси 20 мл DMF и 2,5 мл тетраметилмочевины прибавляли 1,8 мл (14,4 ммоль) NEM, 1,9 г (14,4 ммоль) *HOBT* и 6,8 г (15,0 ммоль) *Boc-Glu(OBzl)-ONp*. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 25°C , разбавляли водой до объема 1,2 л. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (2×500 мл) и этанолом (2×200 мл), высушивали в вакууме. Выход пентапептида (IV) 10,6 г (83%). Аминокислотный анализ: Glu 1,00 (1), Val 0,97 (1), Leu 2,20 (2), Asp 1,00 (1).

5. *Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-ONb (V)*. Раствор 10,6 г (11,6 ммоль) пентапептида (IV) в 70 мл TFA выдерживали 2 ч при 25°C , упаривали, остаток кристаллизовали из эфира, высушивали в вакууме. Выход трифторацетата (IVa) 10,5 г (98%).

К раствору 10,5 г (11,3 ммоль) трифторацетата (IVa) в смеси 10 мл DMF и 5 мл тетраметилмочевины прибавляли 1,4 мл (11,3 ммоль) NEM, 1,6 г (12,0 ммоль) *HOBT*, 5,5 г (12,0 ммоль) *Boc-Glu(OBzl)-ONp*. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 25°C и 2 ч при 40°C . Обработку реакционной смеси вели как в опыте 4. Выход гексапептида (V) 7,0 г (52%). Аминокислотный анализ: Glu 1,80 (2), Val 0,98 (1), Leu 2,11 (2), Asp 1,00 (1).

6. *Boc-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-ONb* (VI). Раствор 7,0 г (6,2 ммоль) гексапептида (V) в 50 мл TFA выдерживали 2 ч при 25° С, упаривали, остаток кристаллизовали из смеси растворителей эфир—этилацетат (10:1). Выход трифторацетата (Va) 7,1 г (количественный).

К раствору 7,1 г (6,2 ммоль) трифторацетата (Va) в 20 мл DMF прибавляли 0,8 мл (6,2 ммоль) NEM, 0,8 г (6,2 ммоль) HOBT, 2,3 г (6,5 ммоль) Boc-Leu-ONp, перемешивали 48 ч при 25° С, 5 ч при 40° С, вносили 20 мл DMF и 5 мл воды, пропускали через ионообменную смолу дауэкс 50 × 8 (200—400 меш, H⁺-форма), раствор разбавляли водой до 2 л. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой (4 × 500 мл) высушивали в вакууме. Выход гептапептида (VI) 5,0 г (65%). Аминокислотный анализ: Glu 2,1 (2), Val 1,0 (1), Leu 3,3 (3), Asp 1,1 (1).

7. *Boc-Lys(Z)-Pro-OH* (VII). К раствору 11,0 г (21,6 ммоль) Boc-Lys(Z)-OSu и 2,7 г (23,3 ммоль) пролина в 10 мл пиридина прибавляли 2,9 мл (23,3 ммоль) NEM. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при 25° С, затем выливали в насыщенный водный раствор NaCl. Выпавшее масло экстрагировали этилацетатом, этилацетатный слой промывали 10% раствором лимонной кислоты (3 × 300 мл), водой, высушивали над Na₂SO₄ осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в 20 мл насыщенного раствора KHCO₃, промывали эфиром. Водный слой подкисляли лимонной кислотой до pH 5, выпавшее масло экстрагировали этилацетатом, этилацетатный слой высушивали над Na₂SO₄, растворитель упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (35 × 100 мм) с силасорбом 600, используя элюцию в градиенте растворителей этилацетат → этанол с 10% AcOH. Выход дипептида (VII) 6,4 г (61%). Аминокислотный анализ: Pro 1,2 (1), Lys 1,0 (1).

8. *Boc-Leu-Lys(Z)-Pro-OH* (VIII). Раствор 6,4 г (13,4 ммоль) дипептида (VII) в 30 мл смеси TFA—AcOH (7:3) выдерживали 30 мин при 25° С, упаривали, промывали гексаном (3 × 200 мл), высушивали в вакууме. Выход трифторацетата (VIIa) 6,4 г (97%).

К раствору 6,4 г (13,0 ммоль) трифторацетата (VIIa) в 4 мл воды, содержащей 2,6 г (26,0 ммоль) KHCO₃ (pH 8), прибавляли раствор 5,6 г (15,8 ммоль) Boc-Leu-ONp в 10 мл диоксана и 1,8 г (13,1 ммоль) HOBT. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при 25° С и обрабатывали как в опыте 7. Выход трипептида (VIII) 4,9 г (63%). Аминокислотный анализ: Pro 1,23 (1), Leu 0,99 (1), Lys 1,02 (1).

9. *Boc-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-OH* (IX). Раствор 4,9 г (8,3 ммоль) трипептида (VIII) в 30 мл смеси TFA—AcOH (7:3) выдерживали 30 мин при 25° С и упаривали. Остаток высушивали в вакууме. Выход трифторацетата трипептида (VIIIa) 5,1 г (количественный).

К раствору 5,1 г (8,3 ммоль) трифторацетата (VIIIa), 1,4 г (8,3 ммоль) HOBT, 3,1 г (7,0 ммоль) Boc-Glu(OBzl)-ONp в 20 мл диоксана прибавляли 1,8 мл (16,6 ммоль) NMM. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 25° С и 2 ч при 40° С, затем диоксан упаривали, водный раствор подкисляли лимонной кислотой до pH 5. Выпавшее масло экстрагировали этилацетатом, этилацетатный слой промывали 10% раствором лимонной кислоты (3 × 200 мл), водой, 1% раствором KHCO₃ в насыщенном растворе NaCl, высушивали над Na₂SO₄, осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток кристаллизовали из гексана. Выход тетрапептида (IX) 5,5 г (82%). Аминокислотный анализ: Glu 1,10 (1), Leu 0,98 (1), Pro 1,21 (1), Lys 1,00 (1).

10. *Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-OH* (X). Раствор 5,5 г (6,8 ммоль) тетрапептида (IX) в 35 мл смеси TFA — AcOH (7:3) выдерживали 30 мин при 25° С и упаривали. Остаток промывали эфиром, высушивали в вакууме. Выход трифторацетата (IXa) 5,5 г (99%).

К раствору 5,5 г (6,7 ммоль) трифторацетата (IXa) в 15 мл диоксана прибавляли 1,5 мл (13,4 ммоль) NMM, 0,9 г (7,0 ммоль) HOBT и 3,3 г (7,2 ммоль) Boc-Glu(OBzl)-ONp. Реакционную смесь перемешивали 24 ч при 25° С и 1 ч при 40° С, затем обрабатывали как в опыте 9 и хроматографировали на колонке с силикагелем, используя элюцию в градиенте растворителей этилацетат → этанол с 10% AcOH. Выход пентапептида (X)

4,7 г (68%). Аминокислотный анализ: Glu 2,1 (2), Leu 1,0 (1), Pro 1,3 (1), Lys 1,0 (1).

11. *Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-OH (XI)*. Раствор 4,71 г (4,58 ммоль) пентапептида (X) в 30 мл смеси TFA—AcOH (7:3) выдерживали 40 мин при 25° С и упаривали. Остаток кристаллизовали из смеси эфир — гексан (1:1), высушивали в вакууме. Выход трифторацетата (XIa) 4,73 г (99%).

К раствору 4,73 г (4,54 ммоль) трифторацетата (XIa) в 10 мл диоксана прибавляли 1,00 мл (9,08 ммоль) NMM, 0,62 г (4,60 ммоль) HOBT и 2,11 г (4,60 ммоль) Boc-Glu(OBzl)-ONp. Реакционную смесь перемешивали 24 ч при 25° С, обрабатывали как в опыте 9 и хроматографировали как в опыте 10. Выход гексапептида (XI) 5,28 г (94%). Аминокислотный анализ: Glu 3,20 (3), Leu 1,00 (1), Lys 0,98 (1), Pro 1,21 (1).

12. *Boc-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-OH (XII)*. Раствор 5,28 г (4,23 ммоль) гексапептида (XI) в 30 мл смеси TFA—AcOH (7:3) выдерживали 1 ч при 25° С и упаривали. Остаток кристаллизовали из эфира. Выход трифторацетата (XIa) 5,22 г (98%).

К раствору 5,22 г (4,14 ммоль) трифторацетата (XIa) в 15 мл диоксана прибавляли 0,91 мл (8,28 ммоль) NMM, 0,56 г (4,14 ммоль) HOBT, 1,63 г (4,61 ммоль) Boc-Leu-ONp. Реакционную смесь перемешивали 24 ч при 25° С и обрабатывали как в опыте 9. Полученное масло кристаллизовали из эфира, промывали смесью эфир — этилацетат (5:1), высушивали в вакууме. Выход гептапептида (XII), 5,00 г (89%). Аминокислотный анализ: Glu 3,2 (3), Leu 2,1 (2), Lys 1,0 (1), Pro 1,2 (1).

13. *Boc-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-ONb (XIII)*. Раствор 198 мг (0,16 ммоль) гептапептида (VI) в 1 мл смеси TFA—AcOH (7 : 3) выдерживали 1 ч при 25° С, упаривали, остаток кристаллизовали из эфира. Выход трифторацетата (VIa) 195 мг (96%).

В раствор 195 мг (0,15 ммоль) трифторацетата (VIa) в 500 мкл DMF вносили 229 мг (0,17 ммоль) HOBT, 16 мкл (0,15 ммоль) NMM, охлаждали до —10° С и прибавляли при перемешивании охлажденный до 0° С раствор 32 мг (0,15 ммоль) DCC в 200 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 20 ч при 25° С, осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали, промывали этилацетатом, высушивали в вакууме и хроматографировали на колонке (36 × 900 мм) с LH-60. Выход тетрадекапептида (XIII) 243 мг (65%). Аминокислотный анализ: Leu 5,22 (5), Glu 5,31 (5), Lys 0,99 (1), Pro 1,23 (1), Val 0,98 (1), Asp 1,05 (1).

14. *Boc-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-ONb (XIV)*. В раствор 100 мг (0,079 ммоль) трифторацетата (VIa) в 400 мл DMF вносили 66 мг (0,138 ммоль) дипептида (VII), 15 мкл (0,138 ммоль) NMM, 19 мг (0,138 ммоль) HOBT, охлаждали до —10° С и прибавляли при перемешивании охлажденный до 0° С раствор 24 мг (0,138 ммоль) DCC в 100 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 24 ч при 25° С. Выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат пропускали через колонку (36 × 900 мм) с LH-20. Выход нонапептида (XIV) 96 мг (76%). Аминокислотный анализ: Lys 1,0 (1), Pro 1,2 (1), Leu 3,2 (3), Glu 2,2 (2), Asp 1,0 (1).

15. *Boc-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-ONb (XV)*. В раствор 172 мг (0,14 ммоль) трифторацетата (VIa) в 500 мкл DMF вносили 15 мкл (0,14 ммоль) NMM, 200 мг (0,34 ммоль) трипептида (VIII), 46 мг (0,34 ммоль) HOBT, реакционную смесь охлаждали до —10° С и прибавляли охлажденный до 0° С раствор 62 мг (0,30 ммоль) DCC в 200 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 24 ч при 25° С, обрабатывали как в опыте 13. Выход декапептида (XV) 170 мг (68%). Аминокислотный анализ: Leu 3,98 (4), Lys 1,04 (1), Pro 1,22 (2), Glu 2,15 (2), Val 0,98 (1), Asp 1,12 (1).

16. *Boc-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-ONb (XVI)*. К раствору 45 мг (0,04 ммоль) трифторацетата (VIa) в 200 мкл DMF вносили 26 мг (0,03 ммоль) тетрапептида (IX), 4 мкл (0,04 ммоль) NMM, 4 мг (0,03 ммоль) HOBT, реакционную смесь охлаждали

до -10°C , прибавляли охлажденный до 0°C раствор 6 мг (0,03 ммоль) DCC в 100 мкл DMF. Далее реакцию вели и реакционную смесь обрабатывали как в опыте 13. Выход ундекапептида (XVI) 50 мг (78%). Аминокислотный анализ: Glu 3,2 (3), Leu 4,1 (4), Pro 1,2 (1), Lys 1,0 (1), Val 1,0 (1), Asp 1,2 (1).

17. *Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-ONb* (XVII). В раствор 50 мг (0,04 ммоль) трифторацетата (VIa) в 200 мкл DMF вносили 47 мг (0,05 ммоль) пентапептида (X), 6 мг (0,05 ммоль) HOBT, 4 мкл (0,04 ммоль) NMM, охлаждали до -10°C , прибавляли охлажденный до 0°C раствор 9 мг (0,04 ммоль) DCC в 100 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 24 ч при 25°C , затем охлаждали до 0°C и прибавляли охлажденный до 0°C раствор 4 мг (0,02 ммоль) DCC в 100 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 24 ч при 25°C . Далее реакцию вели и реакционную смесь обрабатывали как в опыте 13. Выход додекапептида (XVII) 70 мг (80%). Аминокислотный анализ: Glu 4,35 (4), Leu 4,21 (4), Lys 1,00 (1), Pro 1,23 (1), Val 0,99 (1), Asp 1,11 (1).

18. *Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Leu-Asn-Leu-ONb* (XVIII). К раствору 50 мг (0,04 ммоль) трифторацетата (VIa) в 200 мл DMF прибавляли 50 мг (0,04 ммоль) гексапептида (XI), 6 мг (0,05 ммоль) HOBT, 4,4 мкл (0,04 ммоль) NMM и после охлаждения до -10°C раствор 8 мг (0,04 ммоль) DCC в 100 мкл DMF. Далее реакцию вели и реакционную смесь обрабатывали как в опыте 13. Выход тридекапептида (XVIII) 68 мг (61%). Аминокислотный анализ: Glu 5,3 (5), Leu 4,2 (4), Lys 1,0 (1), Pro 1,2 (1), Val 1,0 (1), Asp 1,2 (1).

19. *Boc-Leu-Glu(OBzl)-OBzl* (XIX). В суспензию 3,63 г (10,00 ммоль) HCl·Glu(OBzl)-OBzl в 50 мл диоксана вносили 1,10 мл (10,00 ммоль) NMM и интенсивно перемешивали 15 мин. Выпавший осадок HCl·NMM отфильтровывали, к фильтрату добавляли 3,87 г (11,00 ммоль) Boc-Leu-ONp и 1,35 г (10,00 ммоль) HOBT. Реакционную смесь перемешивали 24 ч, диоксан упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 2% H_2SO_4 (3×300 мл), водой, насыщенным раствором KHCO_3 , водой, высушивали над Na_2SO_4 и упаривали. Выход дипептида (XIX) 4,8 г (89%). Аминокислотный анализ: Leu 1,0 (1), Glu 1,2 (1).

20. *Boc-Leu-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Pro-Leu-Glu(OBzl)-OBzl* (XX). Раствор 100 мг (0,18 ммоль) дипептида (XIX) в 1,5 мл смеси TFA—AcOH (7:3) выдерживали 15 мин при 25°C , упаривали, остаток кристаллизовали из гексана. Выход трифторацетата (XIXa) 102 мг (количественный).

В раствор 146 мг (0,10 ммоль) гептапептида (XII), 102 мг (0,18 ммоль) трифторацетата (XIXa), 27 мг (0,20 ммоль) HOBT в 3 мл DMF вносили 20 мкл (0,18 ммоль) NMM, охлаждали до 0°C и прибавляли охлажденный до 0°C раствор 38 мг (0,18 ммоль) DCC в 200 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при $0-5^{\circ}\text{C}$ и 24 ч при 25°C . Выпавший осадок дидипклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат хроматографировали на колонке (36×900 мм) с LH-60. Выход нонапептида (XX) 100 мг (53%). Аминокислотный анализ: Leu 3,2 (3), Glu 4,3 (4), Lys 1,0 (1), Pro 1,3 (1).

21. *Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu·2HBr* (XXI). 50 мг (0,03 ммоль) нонапептида (XX) деблокировали как описано в опыте 28. Выход нонапептида (XXI) 12 мг (46%). Аминокислотный анализ: Leu 3,1 (3), Glu 4,1 (4), Lys 1,0 (1), Pro 1,3 (1).

22. *Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu·2HBr* (XXII). 125 мг (0,11 ммоль) гептапептида (VI) деблокировали как описано в опыте 28. Выход гептапептида (XXII) 70 мг (77%). Аминокислотный анализ: Leu 3,3 (3), Glu 2,1 (2), Val 1,0 (1), Asn 1,0 (1).

23. *Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu·2HBr* (XXIII). К раствору 50 мг (0,03 ммоль) нонапептида (XIV) в 300 мл TFA прибавляли 10 мкл муравьиной кислоты, далее деблокировали как описано в опыте 28. Выход нонапептида (XXIII) 16 мг (48%). Аминокислотный анализ: Lys 1,0 (1), Pro 1,2 (1), Leu 3,3 (3), Glu 2,1 (2), Val 1,0 (1), Asp 1,1 (1).

24. *Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu*·2HBr (XXIV). 50 мг (0,30 ммоль) декапептида (XV) деблокировали как описано в опыте 28. Выход свободного додекапептида (XXIV) 14 мг (44%). Аминокислотный анализ: Leu 4,1 (4), Lys 1,0 (1), Pro 1,2 (1), Glu 2,2 (2), Val 1,1 (1), Asp 1,0 (1).

25. *Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu*·2HBr (XXV). 40 мг (0,02 ммоль) ундекапептида (XVI) деблокировали как описано в опыте 28. Выход свободного ундекапептида (XXV) 10 мг (42%). Аминокислотный анализ: Glu 3,1 (3), Leu 4,2 (4), Pro 1,2 (1), Lys 1,0 (1), Val 1,0 (1), Asp 1,2 (1).

26. *Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu*·2HBr (XXVI). 50 мг (0,02 ммоль) додекапептида (XVII) деблокировали как описано в опыте 28. Выход свободного додекапептида (XXVI) 12 мг (36%). Аминокислотный анализ: Glu 4,2 (4), Leu 4,3 (4), Lys 1,1 (1), Pro 1,1 (1), Val 1,0 (1), Asp 1,0 (1).

27. *Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu*·2HBr (XXVII). 50 мг (0,02 ммоль) тридекапептида (XVIII) деблокировали как описано в опыте 28. Выход свободного тридекапептида (XXVII) 11 мг (33%). Аминокислотный анализ: Glu 5,3 (5), Leu 4,2 (4), Lys 1,0 (1), Pro 1,2 (1), Val 1,0 (1), Asp 1,2 (1).

28. *Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu*·2HBr (XXVIII). К раствору 10 мг (0,04 ммоль) тетрадекапептида (XIII) в 600 мл TFE прибавляли 20 мкл муравьиной кислоты, гидрировали 48 ч над свежеприготовленной Pd-чернью. Осадок катализатора отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток промывали эфиром, высушивали под вакуумом над P₂O₅, растворяли в 1 мл TFA и пропускали через раствор сухой HBr в течение 1 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток промывали эфиром, высушивали под вакуумом, растворяли в воде и хроматографировали на колонке (2 × 150 мм) с G-15 в 0,1 н. AcOH. Выход свободного тетрадекапептида 30 мг (45%). Аминокислотный анализ: Leu 5,16 (5), Glu 5,23 (5), Lys 1,00 (1), Pro 1,14 (1), Val 0,99 (1), Asp 1,01 (1).

29. *Boc-Asn-Pro-OH* (XXIX). К раствору 5,2 г (45,0 ммоль) пролина 5,4 г (40,0 ммоль) HOBT, 14,1 г (40,0 ммоль) Boc-Asn-ONp в 25 мл пиридина прибавляли 4,9 мл (45,0 ммоль) NMM и перемешивали 15 ч при 25° С. Пиридин упаривали, образовавшееся масло промывали эфиром, растворяли в этилацетате и хроматографировали на колонке (40 × 480 мм) с силикагелем L 40/100, используя элюцию градиентом растворителей этилацетат → этанол. Выход дипептида (XXIX) 8,3 г (63%). Аминокислотный анализ: Asp 1,0 (1), Pro 1,2 (1).

30. *Boc-Lys(Z)-Asn-Pro-OH* (XXX). Раствор 8,3 г (25,2 ммоль) дипептида (XXIX) в смеси TFA — AcOH (7 : 3) выдерживали 45 мин при 25° С, упаривали, остаток промывали эфиром, этилацетатом, высушивали под вакуумом. Выход трифторацетата (XXIXa) 8,5 г (99%).

К раствору 8,6 г (25,0 ммоль) трифторацетата (XXIXa) в 5 мл воды добавляли 4,2 г (50,0 ммоль) NaHCO₃ и раствор 12,4 г (26,0 ммоль) Boc-Lys(Z)-OSu в 20 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при 25° С, диоксан упаривали, остаток разбавляли 2% H₂SO₄ в насыщенном растворе NaCl до объема 1 л. Выпавшее масло экстрагировали этилацетатом, этилацетатный слой промывали 2% H₂SO₄ в насыщенном растворе NaCl (3 × 100 мл), высушивали над Na₂SO₄ и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (30 × 65 мм) с силасорбом 600, используя элюцию (последовательно) этилацетатом (500 мл), смесями этилацетат — этанол (20 : 1, 300 мл), этилацетат — этанол (10 : 1, 300 мл). Выход трипептида (XXX), 6,1 г (41%). Аминокислотный анализ: Lys 1,06 (1), Asp 0,99 (1), Pro 1,00 (1).

31. *Boc-Tyr(OBzl)-Lys(Z)-Asn-Pro-OH* (XXXI). Раствор 6,1 г (10,4 ммоль) трипептида (XXX) в 20 мл смеси TFA — AcOH (7 : 3) выдерживали 45 мин при 25° С, упаривали, остаток промывали эфиром, этилацетатом, высушивали под вакуумом. Выход трифторацетата (XXXa) 6,3 г (количественный).

К раствору 6,3 г (10,4 ммоль) трифторацетата (XXXa) в 7 мл воды прибавляли 1,7 г (20,8 ммоль) NaHCO₃, раствор 5,5 г (11,0 ммоль) Boc-

Tyr(OBzl)-ONp, 1,5 г (11,0 ммоль) HOBt в 25 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали 30 ч при 25° С, диоксан упаривали, пептид осаждали из водного раствора лимонной кислотой. Выпавшее масло экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный слой промывали 2% H₂SO₄ (3 × 100 мл), водой, высушивали над Na₂SO₄. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток кристаллизовали из эфира. Выход тетрапептида (XXXI) 7,1 г (81%). Аминокислотный анализ: Tyr 0,86 (1), Lys 0,99 (1), Asp 1,00 (1), Pro 1,20 (1).

32. *Boc-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(Z)-Asn-Pro-OH* (XXXII). Раствор 7,1 г (8,4 ммоль) тетрапептида (XXXI) в 30 мл смеси TFA — AcOH (7 : 3) выдерживали 1 ч при 25° С, упаривали, остаток промывали эфиром, этилацетатом, высушивали под вакуумом. Выход трифторацетата (XXXIa) 6,8 г (95%).

К раствору 6,8 г (7,9 ммоль) трифторацетата (XXXIa) в 100 мл пиридина прибавляли 1,7 мл (15,9 ммоль) NMM, 1,1 г (8,0 ммоль) HOBt, 3,0 г (8,0 ммоль) Boc-Asn-ONp. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при 25° С, разбавляли эфиром в 10 раз, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, этилацетатом, перекристаллизовывали из метанола. Выход пентапептида (XXXII) 5,4 г (67%). Аминокислотный анализ: Asp 2,30 (2), Tyr 0,89 (1), Lys 1,00 (1), Pro 1,20 (1).

33. *Boc-Asn-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(Z)-Asn-Pro-OH* (XXXIII). Раствор 2,40 г (2,50 ммоль) пентапептида (XXXII) в 15 мл смеси TFA — AcOH (7 : 3) выдерживали 1 ч при 25° С и упаривали. Остаток кристаллизовали из эфира, промывали эфиром, этилацетатом, высушивали под вакуумом. Выход трифторацетата пентапептида (XXXIIa) 2,31 г (95%).

К раствору 2,31 г (2,38 ммоль) трифторацетата (XXXIIa) в 5 мл пиридина прибавляли 0,74 мл (6,76 ммоль) NMM, 0,88 г (3,25 ммоль) HOBt. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при 25° С. Пептид осаждали из раствора 500 мл этилацетата, образовавшийся осадок промывали на фильтре этилацетатом (300 мл), этанолом (200 мл) и высушивали под вакуумом. Выход гексапептида (XXXIII) 2,45 г (96%). Аминокислотный анализ: Asp 3,30 (3), Tyr 0,88 (1), Lys 1,01 (1), Pro 1,23 (1).

34. *Boc-Ile-Asn-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(Z)-Asn-Pro-OH* (XXXIV). Раствор 2,45 г (2,28 ммоль) гексапептида (XXXIII) в 10 мл смеси TFA — AcOH (7 : 3) выдерживали 1,5 ч при 25° С, упаривали, остаток кристаллизовали из эфира, промывали эфиром, этилацетатом и высушивали под вакуумом. Выход трифторацетата (XXXIIIa) 2,48 г (количественный).

2,48 г (2,28 ммоль) трифторацетата (XXXIIIa) растворяли в 4,5 мл пиридина, прибавляли 0,50 мл (4,56 ммоль) NMM, 1,06 г (3,00 ммоль) Boc-Ile-ONp и 0,40 г (3,00 ммоль) HOBt. Реакцию вели и реакционную смесь обрабатывали как в опыте 33. Выход гептапептида (XXXIV) 2,40 г (84%). Аминокислотный анализ: Ile 1,00 (1), Asp 3,20 (3), Tyr 0,88 (1), Lys 1,00 (1), Pro 1,20 (1).

35. *Boc-Lys(Z)-Leu-ONb* (XXXV). К суспензии 2,68 г (6,00 ммоль) Tos-Leu-ONb в 10 мл этилацетата при энергичном перемешивании прибавляли 5 мл 10% NaHCO₃ и после растворения осадка этилацетатный слой промывали 10% NaHCO₃ (3 × 100 мл), водой, высушивали над Na₂SO₄. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в диоксане, охлаждали до 5° С и прибавляли при перемешивании 3,10 г (5,71 ммоль) Boc-Lys(Z)-OPfp. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 5° С, 24 ч при 25° С и разбавляли водой в 10 раз. Выпавший осадок экстрагировали этилацетатом, этилацетатный слой промывали 2% H₂SO₄, водой, 1% NaHCO₃, водой, высушивали над Na₂SO₄. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток кристаллизовали из гексана. Выход дипептида (XXXV) 2,91 г (77%). Аминокислотный анализ: Lys 1,00 (1), Leu 1,00 (1).

36. *Boc-Asn-Gly-ONb* (XXXVI). К раствору 9,60 г (4,20 ммоль) HBr·Gly-ONb в 30 мл DMF добавили 0,46 мл (4,20 ммоль) NMM и 3,64 г (2,70 ммоль) Boc-Asn-ONp. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при 25° С, разбавляли водой до 1 л. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 2% H₂SO₄, водой, 10% NaHCO₃, водой, смесью рас-

творителей этилацетат — этанол (5 : 1), высушивали под вакуумом над P_2O_5 . Выход дипептида (XXXVI) 11,0 г (94%). Аминокислотный анализ: Asp 1,0 (1), Gly 1,2 (1).

37. *Boc-Leu-Asn-Gly-ONb* (XXXVII). К раствору 10,0 г (2,3 ммоль) дипептида (XXXVI) в 5 мл AcOH прибавляли 13,0 мл (10,4 ммоль) $Et_2O \cdot BF_3$, выдерживали 40 мин при 25° С, упаривали, остаток кристаллизовали из эфира. Выход трифторацетата (XXXVIa) 9,5 г (93%).

9,5 г (2,1 ммоль) трифторацетата (XXXVIa) растворяли в 5 мл диоксана, охлаждали до 5° С, прибавляли 2,3 мл (2,1 ммоль) NMM, 9,8 г (3,0 ммоль) Boc-Leu-OSu. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 5° С 24 ч при 25° С и упаривали. Остаток растворяли в 30 мл этилацетата, промывали 2% H_2SO_4 , водой и высушивали над Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток кристаллизовали из эфира и высушивали под вакуумом. Выход трипептида (XXXVII) 10,9 г (82%). Аминокислотный анализ: Leu 1,0 (1), Asp 1,2 (1), Gly 1,3 (1).

38. *Boc-Ile-Asn-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(Z)-Asn-Pro-Lys(Z)-Leu-ONb* (XXXVIII). А. К раствору 656 г (0,55 ммоль) гептапептида (XXXIV), 388 мг (0,60 ммоль) трифторацетата (XXXVa), 81 мг (0,60 ммоль) HOBT в 2 мл DMF прибавляли 66 мкл (0,60 ммоль) NMM и после охлаждения до -10° С при перемешивании охлажденный до 0° С раствор 114 мг (0,55 ммоль) DCC в 500 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С, 20 ч при 25° С, снова охлаждали до 0° С и прибавляли охлажденный до 0° С раствор 50 мг (0,24 ммоль) DCC в 200 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 24 ч при 25° С, выпавший осадок дициклогексимочевины отфильтровывали и фильтрат упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (25 × 800 мм) с TSK-гелем HW-40 (две порции по 250 мг). Выход нонапептида (XXXVIII) 478 мг (48%). Аминокислотный анализ: Ile 1,10 (1), Asp 3,30 (3), Tyr 0,84 (1), Lys 2,20 (2), Pro 1,20 (1), Leu 1,10 (1).

Б. В раствор 656 мг (0,55 ммоль) гептапептида (XXXIV), 388 мг (0,60 ммоль) трифторацетата (XXXVa), 81 мг (0,60 ммоль) HOBT в 2 мл DMF вносили 66 мкл (0,60 ммоль) NMM, охлаждали до -10° С и прибавляли при перемешивании охлажденный до 0° С раствор 105 мг (0,55 ммоль) EDAC в 200 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С, 24 ч при 25° С, растворитель упаривали, остаток промывали водой, высушивали под вакуумом и хроматографировали на колонке (25 × 800 мм) с TSK-гелем HW-40 (четыре порции по 250 мг). Выход нонапептида (XXXVIII) 810 мг (82%). Аминокислотный анализ: Ile 1,00 (1), Asp 3,40 (3), Tyr 0,85 (1), Lys 2,20 (2), Pro 1,20 (1), Leu 1,00 (1).

39. *Boc-Leu-Asn-Gly-Ile-Asn-Asn-Tyr(OBzl)-Lys(Z)-Asn-Pro-Lys(Z)-Leu-ONb* (XXXIX). Раствор 213 мг (0,12 ммоль) нонапептида (XXXVIII) в 500 мкл смеси TFA — AcOH (7 : 3) выдерживали 1,5 ч при 25° С и упаривали. Остаток кристаллизовали из эфира и высушивали под вакуумом. Выход трифторацетата (XXXVIIIa) 200 мг (97%).

Раствор 5,0 г (7,8 ммоль) трипептида (XXXVII) в 3 мл этанола гидрировали 2 ч Pd/C (10%) в токе H_2 , катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в воде, промывали эфиром и лиофилизировали. Выход трипептида (XXXVIIa) 3,7 г (количественный).

В раствор 200 мг (0,12 ммоль) трифторацетата (XXXVIIIa) в 400 мкл DMF вносили 113 мг (0,28 ммоль) трипептида (XXXVIIa), 13 мкл (0,12 ммоль) NMM, 38 мг (0,28 ммоль) HOBT, охлаждали до 0° С, прибавляли охлажденный до 0° С раствор 118 мг (0,28 ммоль) EDAC в 200 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0—5° С и 24 ч при 25° С. DMF упаривали, остаток хроматографировали на колонке (25 × 800 мм) с TSK-гелем HW-40. Выход ундекапептида (XXXIX) 135 мг (57%). Аминокислотный анализ: Leu 2,10 (2), Asp 4,31 (4), Ile 1,00 (1), Gly 1,32 (1), Tyr 0,86 (1), Lys 2,10 (2), Pro 1,22 (1).

40. *Leu-Asn-Gly-Ile-Asn-Asn-Tyr-Lys-Asn-Pro-Lys-Leu \cdot 3TFA* (XL). Раствор 100 мг (0,05 ммоль) ундекапептида (XXXIX) в 500 мкл TFA выдерживали 1 ч при 25° С, упаривали, остаток кристаллизовали из эфира, высушивали под вакуумом и растворяли в TFE. В раствору прибавляли

62 мг (1,00 ммоль) $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$, 4 мкл (0,10 ммоль) муравьиной кислоты и гидрировали 10 ч над свежеприготовленной Pd-чернью. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в воде, промывали эфиром, хроматографировали на колонке (20 × 500 мм) с G-15 в 0,1 н. AcOH . Выход ундекапептида (XL) 40 мг (58%). Аминокислотный анализ: Leu 2,0 (2), Asp 4,2 (4), Gly 1,2 (1), Ile 1,0 (1), Tyr 0,9 (1), Lys 1,0 (1), Pro 1,1 (1).

41. *Конъюгация пептидов с белками-носителями.* Раствор 1,0 мг пептида в 20 мкл воды добавляли к 2 мг KLN в 0,2 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,0. К полученному раствору в течение 1 ч при 20° С прибавляли 100 мкл 0,02 М водного раствора глутарового альдегида. Реакционную смесь оставляли на 18 ч и затем анализировали против натрий-фосфатного буфера.

42. *Проведение ИФА.* В лунки планшета вносили 100 мкл раствора пептида или IL-2 в концентрации 1—5 мкг/мл в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl, pH 7,2 (ФСБ). После инкубации в течение 18 ч при 4° С содержимое лунок планшета удаляли, лунки промывали 0,05% раствором твина-20 в ФСБ (ФСБ-Т), вносили по 200 мкл 1% раствора бычьего сывороточного альбумина и инкубировали 1 ч при 37° С. После промывки лунок планшета ФСБ-Т вносили по 100 мкл тестируемого препарата, содержащего антитела. При конкурентном анализе одновременно с антителами добавляли и конкурирующий пептид. Через 1 ч инкубации при 37° С лунки промывали ФСБ-Т и вносили 100 мкл козьих антител к иммуноглобулинам кролика или кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена в разведении 1 : 1000, и выдерживали при 37° С. После промывки планшета ФСБ-Т вносили 100 мкл раствора *o*-фенилендиамина (1 мг в 1 мл 1% лимонной кислоты, pH 4,5) и через 15—30 мин реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 100 мкл 1 М H_2SO_4 . Интенсивность окраски измеряли при 492 нм с помощью спектрофотометра Multiscan.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kyte J., Doolittle R. F. // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. № 1. P. 105—132.
2. Hopp T. P., Woods K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824.
3. Altman A., Cardenas J. M., Houghten R. A., Dixon F. J., Theofilopoulos A. N. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 10. P. 2176—2180.
4. Altman A., Isakov N. // Scientific Report 84—85. Research Institute of scripps Clinic. USA. 1985. V. 11. P. 69—70.
5. Jensen J., Danho W., Tsien W.-H., Gately M. // J. Cell. Biochem., 10A Suppl., UCLA Symp. on Molecular and Cellular Biol. 1986. P. 76.
6. Ju G., Collins L., Bhatt R., Crowl R., Killian P., Tsien W.-H., Truitt T., Chizzonite R. // J. Cell. Biochem., 10A Suppl., UCLA Symp. on Molecular and Cellular Biol. 1986. P. 77.
7. Kuo L.-M., Robb R. K. // J. Cell. Biochem., 10A Suppl., UCLA Symp. on Molecular and Cellular Biol. 1986. p. 78.
8. Оноприенко Л. В., Михалева И. И., Лунев В. Е., Несмеянов В. А. // Тез. VII Всесоюз. симпозиум по химии белков и пептидов. Таллин, 1987. С. 222.
9. Стюарт Д., Янг Д. Твердофазный синтез пептидов. М.: Мир, 1974. С. 76, 77.

Поступила в редакцию 18.XI.1988

SYNTHESIS AND IMMUNOGENIC PROPERTIES OF PEPTIDES CORRESPONDING TO 59—72 AND 25—36 SEQUENCES OF HUMAN IL-2

ONOPRIENKO L. V., MIKHALEVA I. I., LUNEV V. E.,
NESMEJANOV V. A., IVANOV V. T.
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

Synthesis of peptides corresponding to the 59—72 and 25—36 sequences of human IL-2 is reported. The former peptide, which had been shown to be immunogenic in the protein molecule, was prepared to obtain anti-peptide antibodies for isolation and purification of the recombinant IL-2. We located the epitope at the C-terminus of this peptide. In accordance with the IL-2 secondary structure and hydrophilicity profile analysis, the 25—36 fragment was chosen as the potential epitope. The peptides were synthesized by conventional methods in solution, conjugated with a protein carrier, and polyclonal rabbit antisera were obtained. Antibodies against both peptides were shown to be specific to human IL-2 in ELISA. Besides, monoclonal antibodies to IL-2 recognized in ELISA the 59—72 peptide, suggesting the epitope located in this region to be main one in the protein molecule.