



УДК 547.96.057:542.95:546.11-039

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА ДЛЯ ЗАМЫКАНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ МОСТИКОВ В ПЕПТИДАХ

© 2004 г. М. В. Сидорова^{**}, А. С. Молокоедов^{*},
А. А. Азьмуко^{*}, Е. В. Кудрявцева^{*}, Е. Краузе^{**},
М. В. Овчинников^{*}, Ж. Д. Беспалова^{*}

^{*}Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ России,
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15-а;

^{**}Институт молекулярной фармакологии, Берлин, ФРГ

Поступила в редакцию 02.10.2002 г. Принята к печати 29.11.2002 г.

Изучено применение перекиси водорода для создания внутримолекулярных дисульфидных мостиков в 15 пептидах различной длины и структуры. Показано, что реакция окисления пептидных тиолов перекисью водорода проходит в мягких условиях, без ощутимого образования побочных продуктов по остаткам триптофана, тирозина и метионина, а соответствующие циклические дисульфиды получаются с высокими выходами, в большинстве случаев превосходящими выходы тех же соединений при использовании других окислителей, в частности йода. Установлено, что применение перекиси водорода в органической среде обеспечивает достаточно высокие выходы окситоцина и октреотида и при переходе к крупномасштабному синтезу последних (до десятков граммов).

Ключевые слова: химический синтез, природные пептиды и их аналоги, дисульфидная связь, перекись водорода.

ВВЕДЕНИЕ

Хотя современный уровень развития пептидной химии позволяет получать практически любые пептиды, их аналоги и даже небольшие белки, синтез пептидов, содержащих внутримолекулярные дисульфидные мостики, до сих пор представляется достаточно сложной задачей [1, 2]. Зачастую низкие выходы целевых циклических продуктов на стадии создания S–S-связей перечеркивают все усилия, потраченные на синтез линейных предшественников. Среди многообразия существующих приемов наибольшее распространение получили синтез циклических дисульфидов пептидов из соответствующих SH-предшественников (А) и прямое превращение цистеинзащищенных производных в циклические продукты (Б), когда деблокирование SH-групп и циклизация происходят одновременно. Реакции циклизации в обоих случаях, как правило, проводят в очень разбавленных растворах с концентрацией

пептида – 10^{-4} – 10^{-5} М во избежание межмолекулярной агрегации и протекания побочных реакций [1]. Направленное замыкание S–S-связей в условиях высокого разбавления в значительной степени зависит от структурных особенностей пептида, в частности от природы и количества аминокислот, разделяющих цистеиновые остатки [3, 4]. При циклизации свободных тиолов (вариант А) с помощью кислорода воздуха выходы целевых продуктов обычно невелики – 9–15% [2]. При использовании феррицианида калия или диметилсульфоксида получают в основном гомогенные реакционные смеси и выходы циклических продуктов существенно выше (от 20 до 60, а в отдельных случаях и до 80% в зависимости от структуры пептида [2, 5]), однако для удаления избытков этих окислителей необходима многостадийная очистка продукта [1]. Очень привлекательное создание S–S-мостиков в одной стадии с помощью йода часто сопровождается побочными реакциями [1, 2, 6–8] и ограничено применимо для Trp- и Met-содержащих пептидов.

При синтезе ряда пептидов с внутримолекулярными дисульфидными мостиками в масштабе, выходящем за рамки обычных лабораторных исследований, мы столкнулись с необходимостью подбора такого способа окисления SH-групп в самых различных пептидах, который бы обеспечивал получение достаточно гомогенных реакционных смесей и простое (желательно одностадий-

Использованы сокращения, рекомендованные комиссией IUPAC-IUB (Eur. J. Biochem. 1984. V. 183. P. 9–37), а также: AcOH – уксусная кислота; AcM – ацетамидометил; DIC – N,N'-диизопрпилкарбодимид; dF – D-фенилаланин; dW – D-триптофан; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; ET – эндотелин; βMra – β-меркаптопропионовая кислота; Pmc – 2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил; NMP – N-метилпирролидон; u-PAR1 – рецептор урокиназы.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 414-67-16; эл. почта: peptide@cardio.ru; факс: (095) 414-67-86).

ное) выделение высокочистого продукта. Наше внимание привлекла перекись водорода, отдельные упоминания об использовании которой для циклизации пептидных тиолов имеются в литературе [9]. Проведя сравнительную оценку эффективности различных окислителей (O_2 , I_2 , $K_3[Fe(CN)_6]$, H_2O_2), мы продемонстрировали преимущества применения перекиси водорода для замыкания дисульфидных связей во фрагментах гликопротеина gp41 различных штаммов (Z3, ELI, BRU, ROD) ВИЧ [6, 10, 11]. С нашими выводами о перспективности перекиси водорода хорошо коррелируют данные работы [12], также посвященной сравнению различных методов циклизации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа обобщает результаты наших экспериментов по использованию перекиси водорода для замыкания дисульфидных мостиков в пептидах различной длины и структуры. В табл. 1 представлены аминокислотные последовательности синтезированных соединений. Для оценки возможностей и ограничений применения перекиси водорода на стадии циклизации были выбраны пептиды с одним и двумя дисульфидными мостиками, с различным размером цикла (от 6 до 17 а.о.), включающие чувствительные к окислению аминокислоты – метионин, тирозин и триптофан. Нам представлялось также интересным оценить воспроизводимость результатов циклизации при увеличении масштаба синтеза.

Синтез антигенных детерминант белка gp41 ВИЧ – пептидов P1-P3, P5 [6, 10, 11], эндотелинов 1 и 3 [7] и фрагмента (1-16) рецептора урокиназы u-PAR1 [13] описан ранее. Антигенная детерминанта гликопротеина gp41 ВИЧ-2 – пептид P4, атриопептины (крысы) II и III, атриальный натрийуретический фактор 1-28 (крысы) и соматостатин-(1-14) были получены твердофазным методом на смоле Ванга. В сочетании с N^{α} -Fmoc-защитой для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот использовали следующие защиты: Bu' – для серина, треонина, тирозина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, Woc – для лизина, Ttt – для гистидина, аспарагина, глутамина, Pmc – для аргинина. При синтезе всех пептидов, за исключением фрагмента u-PAR1-(1-16) (табл. 1), остатки цистеина защищали Acм-группой. При синтезе фрагмента u-PAR1-(1-16), содержащего три остатка цистеина, остаток Cys^3 защищали Acм-группой, а остатки Cys^6 и Cys^{12} , между которыми в белке существует дисульфидный мостик, – Ttt -защитой. Для создания амидной связи применяли DIC/NOBt-метод. Пептиды отщепляли от носителя действием реагента K [14]. Линейные Acм-предшественники пептидов, а также линейный SH-предшественник фрагмента u-PAR1-(1-16) очищали с помощью препаративной ВЭЖХ до

95% чистоты. Линейные Acм-предшественники окситоцина, октреотида и $[\beta Mpa^1, Arg^8]$ вазопрессина, полученные классическими методами пептидной химии в растворе, предоставлены ЗАО “Синтез пептидов”.

Для отщепления Acм-защитных групп во всех случаях мы применяли ацетат ртути (2 экв. на каждую SH-функцию) в кислой водной среде (30–50% $AsOH$ или 30% муравьиная кислота), а для последующего удаления ионов ртути использовался сероводород.

Все синтезированные пептиды мы условно разбили на следующие группы: пептиды с одним дисульфидным мостиком, не содержащие метионина (P1-P5, APII, APIII, α -ANF_r, соматостатин-1-14, окситоцин, октреотид, аналог вазопрессина); метионинсодержащие пептиды (ET-1 и u-PAR1-(1-16) рецептора урокиназы); пептиды с двумя дисульфидными мостиками (ET-1 и ET-3).

Замыкание дисульфидных мостиков проводили в водных или водно-органических ($MeOH-H_2O$, $DMF-H_2O$, диоксан- H_2O) растворах в условиях высокого разбавления [1] с концентрацией пептидов 0.5–1 мг/мл при pH 6.5–8.5. При циклизации пептидов, не содержащих метионина (табл. 1), использовали 5–15-кратные избытки перекиси водорода. В случае метионинсодержащих пептидов применяли 1.5–2-кратные избытки перекиси водорода. Для контроля происходящих превращений использовали ВЭЖХ. Для каждого из изученных пептидов были подобраны условия аналитической ВЭЖХ, в которых соответствующие SH- и SS-формы пептида хорошо разрешались (рис. 1). Во всех изученных нами случаях окисление происходило в течение 15–40 мин. После завершения окисления реакционную смесь подкисляли уксусной кислотой до pH 4, целевые пептиды выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ на диасорбе 130T (C16). Полученные циклические дисульфиды пептидов охарактеризованы данными аминокислотного анализа, масс-спектрометрии, аналитической ВЭЖХ (табл. 3 в “Эксперимент. части”), а их выходы представлены в табл. 1. При обсуждении полученных результатов и в табл. 1 и 3 для удобства сравнения с приводимыми литературными данными даны выходы, не скорректированные на содержание пептидов в соответствующих лиофилизатах.

В случае пептидов с относительно небольшим размером цикла (P1-P5, окситоцин, октреотид, (табл. 1)) замыкание S-S-мостиков проходило без существенного образования побочных продуктов; содержание циклических продуктов в реакционных смесях окисления было достаточно высоким и составляло 85–95%. Выходы циклических продуктов (см. табл. 1) в расчете на соответствующие линейные $[Cys(Acм)]_2$ -предшественники также были достаточно высоки (от 69 до 90%).

Известно, что для циклизации дезамино-аналогов некоторых природных пептидов приходится использовать достаточно жесткие условия. Например, дисульфидная связь в окситоцине замыкается легко уже кислородом воздуха, замкнуть же S–S-мостик в дезамино-окситоцине удастся только под действием $K_3[Fe(CN)_6]$ [15]. В случае аналога вазопрессина, содержащего вместо *N*-концевого цистеина остаток неприродной β -меркаптопропионовой кислоты (см. табл. 1), замыкание дисульфидного мостика с помощью перекиси водорода протекало так же быстро и гладко, как и в случае природных пептидов. Выход $[\beta\text{Mpa}^1, \text{Arg}^8]$ вазопрессина составил 81%.

При замыкании дисульфидной связи в пептидах с достаточно большим размером цикла, в которых остатки цистеинов разделяют 10 (соматостатин) и 15 (атриальные пептиды) аминокислот, мы отмечали образование побочных продуктов (вероятно, дисульфидных олигомеров [12]), которое снижало содержание целевых циклических дисульфидов в реакционных смесях до 70–75% (по данным ВЭЖХ). Выходы соответствующих продуктов при этом падали до 50–60% (см. табл. 1). С наибольшими трудностями мы столкнулись при создании дисульфидного мостика в соматостатине, выход которого практически не зависел от концентрации исходного соединения (в интервале от 0.2 до 1.0 мг/мл), но значительно изменялся при переходе от водных к водно-органическим растворам (26% – при циклизации в 0.1 М NH_4OAc , pH 6.8; 35% – в смеси $\text{MeOH-H}_2\text{O}$, pH 6.8; 51% – в смеси диоксан- H_2O , pH 6.8). Выделенный из реакционной смеси окисления побочный продукт при обработке дитиотреитом переходил в тиольную форму и, по всей вероятности, представлял собой димер соматостатина. Образование подобных димеров характерно для соматостатина и описано в литературе [16].

Следует отметить, что во всех изученных нами случаях при синтезе природных пептидов с одним дисульфидным мостиком выходы циклических продуктов, полученных с использованием перекиси водорода, были существенно выше, чем при циклизации йодом (табл. 1).

Применение перекиси водорода для циклизации метионинсодержащих пептидов считается проблематичным из-за чрезвычайно легкого окисления метионина в соответствующий сульфоксид [12]. Поскольку результаты наших экспериментов по использованию перекиси водорода для создания S–S-мостиков в метионинсодержащих пептидах подробно изложены ранее [7, 13], здесь мы остановимся только на кратком описании условий циклизации в этом случае. Ранее мы установили, что собственно процесс образования дисульфидного мостика под действием перекиси водорода не сопровождается окислением метионина в соот-

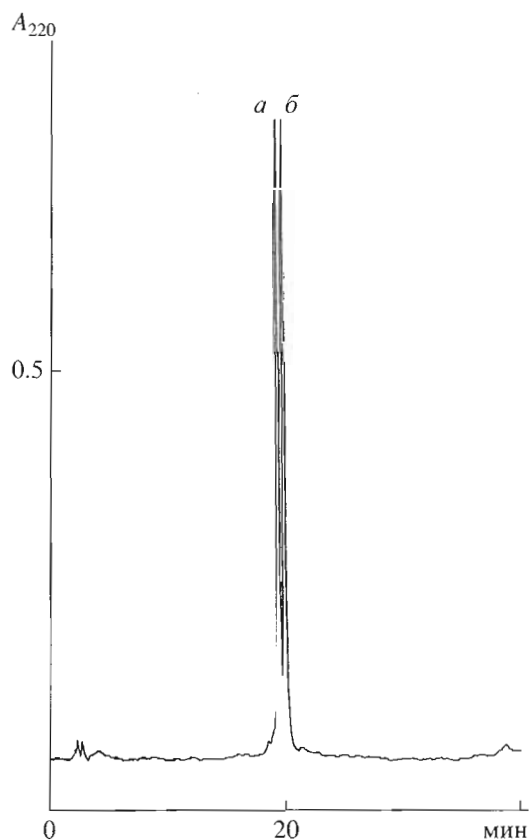


Рис. 1. Аналитическая ВЭЖХ смеси (а) окисленной (S–S)- и (б) восстановленной (SH)-форм атриопептина II крысы (табл. 1) на колонке Ultrasphere ODS (4.6 × 250 мм), 5 мкм. Элюирование градиентом от 10 до 60% буфера Б в буфере А за 40 мин.

ветствующий сульфоксид в заметных количествах. Эта побочная реакция происходит уже после завершения циклизации при подкислении реакционной смеси перед выделением целевого дисульфида. Поэтому повышение pH реакционной среды до 8–9, применение небольших избытков перекиси водорода (не более 2 экв.) и барботирование реакционной смеси перед подкислением инертным газом через стеклянный капилляр в течение 30 мин позволяют успешно использовать перекись водорода для метионинсодержащих пептидов (ET-1, u-PAR1- (1–16)).

Подобранные условия были применены для одновременного замыкания двух дисульфидных мостиков в эндотелинах 1 и 3 [7]. Оказалось, что, как и в случае применения кислорода воздуха [17], использование перекиси водорода ведет к преимущественному образованию изомера с природным положением S–S-мостиков. Однако, если при использовании кислорода воздуха соотношение природного изомера и двух других возможных дисульфидных изомеров для ET-1 составляет

Таблица 1. Сравнение выходов циклических дисульфидов пептидов, полученных с использованием йода и перекиси водорода

Шифр	Пептид	Аминокислотная последовательность	Выход ^a , %		Содержание пептида в лиофилизате ^г , %
			I ₂	H ₂ O ₂	
P1	gr41-(598-609), ВИЧ-1 (Z3)	H-LGLWGCSGKLIJC-NHEt	51[11]	75-85[11]	82
P2	gr41-(598-609), ВИЧ-1 (ELI)	H-LGIWGCSCGKHC-NHEt	56[11]	85-90[11]	85
P3	gr41-(593-603), ВИЧ-2 (ROD)	H-NSWGCAFRQVC-NHEt	66[11]	80-87[11]	89
P4	gr41-(586-607), ВИЧ-2 (ROD)	H-LQDQARLNSWGCAFRQVCHTTV-OH	<5	82	90
P5	gr41-(601-617), ВИЧ-1 (BRU)	H-WGCSGKLICTTAVPwana-OH	25[11]	85-90[11]	92
	Окситоцин	H-CYIQNCPLG-NH ₂	52	75	94
	Октреотид	H-dFCFzWKTC-NHCH[CH(OH)CH ₃]CH ₂ OH	-	80	87
	[βMpa ¹ , Arg ⁸]вазопрессин	βMpa-YFQNCPRG-NH ₂	-	81	88
API _I	Атрипептин II (крысы)	H-SSCFGGRIDRIGAQSGLGCNSFR-OH	23[19, 20]	83	86
API _{II}	Атрипептин III (крысы)	H-SSCFGGRIDRIGAQSGLGCNSFRY-OH	26[19, 20]	50	82
	Соматостатин-(1-14)	H-AGCKNFFWKFTTSC-OH	-	51	91
α-ANF _I -(1-28)	Атриальный натрийуретический фактор (1-28) (крысы)	H-SLRRSSCFGGRIDRIGAQSGLGCNSFRY-OH	20[19, 20]	62	82
u-PAR1-(1-16)	Фрагмент (1-16) рецептора урокиназы	H-LRC(Asn)MQCKTDGDCRVEE-OH	-	30 ^b [13]	84
ET-1	Эндотелин-1	H-CSCSSLMDKECVYFCHLDIIW-OH	-	26 ^b [7]	91
ET-3	Эндотелин-3	H-CTCFTYLDKECVYYCHLDIIW-OH	-	20 ^b [7]	80

^a Выходы приведены в расчете на [Cys(Asn)]₂-производные соответствующих линейных пептидов, реакции замыкания дисульфидных мостиков проводили исходя из 100-500 мг соответствующих линейных предшественников пептидов при концентрациях 0.5-1.0 мг/мл. Для каждого из приведенных соединений было проведено не менее 3-х опытов по циклизации, разбор выходов колебался в интервале 10%. Для удобства сравнения полученных результатов с литературными данными все выходы не скорректированы на содержание пептидов в соответствующих лиофилизатах.

^b Выходы приведены в расчете на [Cys(SH)]₂-производные соответствующих пептидов.

^c Выходы приведены в расчете на [Cys(Asn)]₄-производные соответствующих линейных пептидов.

^г Данные получены с помощью количественного аминокислотного анализа для соединений, синтезированных с использованием перекиси водорода.

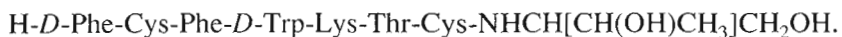
Таблица 2. Результаты модельных опытов по замыканию дисульфидных связей в окситоцине и октреотиде с помощью перекиси водорода в водной и органической среде при различных концентрациях исходных дитиолов

Пептид	Растворитель	Концентрация, мг/мл	Содержание целевого продукта в реакционной смеси, % по данным ВЭЖХ
Окситоцин	H ₂ O	1	82
		5	58
		10	50
	DMF-CH ₃ OH, 1 : 5	1	87
		5	71
		10	72
		20	58
Октреотид	CH ₃ OH	1	98
		10	98
		20	96
		50	94
		100	93

3/1/0, то для перекиси водорода – это соотношение составляет 10/1/0. При синтезе ET-3 это соотношение составляет 4/1/2 [7]. Кроме того, в случае применения перекиси водорода реакция завершается уже за 40 мин, тогда как окисление кислородом воздуха – многочасовой процесс.

Итак, нами было показано несомненное преимущество применения перекиси водорода для превращения пептидных тиолов в соответствующие

дисульфиды в ряду пептидов различной степени сложности. Следующим этапом работы было изучение возможности применения перекиси водорода при увеличении масштаба синтеза на примере двух обладающих гормональной активностью пептидов – окситоцина и октреотида. Октреотид (сандостатин) является синтетическим аналогом соматостатина, разработанным фирмой Sandoz [18], и имеет следующую структуру:



Оба пептида разрешены к практическому применению в нашей стране в качестве лекарственных препаратов. Последнее обстоятельство диктует необходимость разработки именно крупномасштабных схем синтеза этих пептидов (в том числе и для стадии циклизации), когда загрузки составляют десятки и сотни граммов. Как следует из приведенной выше табл. 1, применение перекиси водорода дало неплохие результаты при замыкании S-S-мостиков в синтезе окситоцина и октреотида в условиях высокого разбавления (концентрация пептида – 1 мг/мл ($\approx 10^{-3}$ М)). Выходы окситоцина и октреотида в этих условиях составляли 75 и 80% соответственно в расчете на линейные [Cys(Asc)]₂-предшественники. Однако применение условий высокого разбавления при крупномасштабных синтезах нетехнологично, так как объемы реакционных смесей окисления резко возрастают (так, при циклизации уже 20 г

линейного предшественника соответствующего пептида объем реакционной смеси составит как минимум 20 л). Поэтому нами были предприняты попытки изучения процесса циклизации при увеличивающихся концентрациях линейных предшественников выбранных пептидов. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 2.

При получении окситоцина с использованием перекиси водорода в водной среде с pH 7.2 (см. табл. 2) процентное содержание целевого продукта в реакционной смеси катастрофически уменьшается с ростом концентрации линейного предшественника (от 81.1% при концентрации пептида – 1 мг/мл до 49.8% при концентрации 10 мг/мл), т.е. падает почти вдвое. При этом площадь пика, соответствующего окситоцину, в пробах реакционных смесей, приведенных к одинаковым концентрациям, уменьшается приблизительно в 3.5 раза. Наиболее вероятной причиной этого является образо-

Таблица 3. Характеристики циклических пептидов, полученных с использованием H₂O₂

Пептид	Брутто-формула	Чистота по ВЭЖХ, %	Молекулярная масса		Аминокислотный анализ*
			вычислено	найде-но MS	
gp41-(586–607) (P4)	C ₁₀₈ H ₁₆₇ N ₃₅ O ₃₂ S ₂	96.0	2531.9	2531.4 ^a	D/N 1.9(2), T 1.7(2), S 0.8(1), E/Q 3.1(3), G 1.0(1), A 1.7(2), V 1.8(2), L 2.0(2), F 1.1(1), H 1.0(1), W 0.6(1), R 2.2(2)
Окситоцин	C ₄₃ H ₆₆ N ₁₂ O ₁₂ S ₂	97.0	1007.2	1007.7 ^b	D/N 1.0(1), E/N 1.1(1), G 1.0(1), I 0.9(1), L 0.9(1), Y 0.8(1)
Октреотид	C ₄₉ H ₆₆ N ₁₀ O ₁₀ S ₂	98.2	1019.3	1020.3 ^b	T 0.9(1), F 2.0(2), W 0.7(1), K 1.0(1)
[βMpa ¹ , Arg ⁸]-вазопрессин	C ₄₆ H ₆₄ N ₁₄ O ₁₂ S ₂	98.0	1069.2	1068.0 ^b	D/N 1.0(1), E/Q 1.1(1), G 1.0(1), Y 0.9(1), F 1.0(1), R 1.0(1)
APII _r	C ₉₈ H ₁₅₆ N ₃₄ O ₃₂ S ₂	98.1	2386.6	2386.0 ^a	D/N 2.2(2), S 3.6(4), E/Q 1.2(1), G 5.2(5), A 1.0(1), I 1.9(2), L 1.0(1), F 2.1(2), R 3.0(3)
APIII _r	C ₁₀₇ H ₁₆₅ N ₃₅ O ₃₄ S ₂	98.3	2549.8	2549.5 ^a	D/N 2.1(2), S 3.6(4), E/Q 1.2(1), G 5.2(5), A 1.0(1), I 1.9(2), L 1.0(1), Y 0.9(1), F 2.1(2), R 3.1(3)
Соматостатин-(1–14)	C ₇₆ H ₁₀₄ N ₁₈ O ₁₉ S ₂	97.5	1637.9	1640.5 ^b	D/N 1.1(1), T 1.8(2), S 0.9(1), G 1.0(1), A 1.0(1), F 2.9(3), W 0.7(1), K 2.1(2)
α-ANF _r	C ₁₂₈ H ₂₀₅ N ₄₅ O ₃₉ S ₂	98.0	3062.4	3062.4 ^a	D/N 2.1(2), S 4.3(5), E/Q 1.2(1), G 5.2(5), A 1.0(1), I 1.8(2), L 2.0(2), Y 0.9(1), F 2.0(2), R 4.9(5)

* Содержание пролина и цистеина в гидролизатах соответствующих пептидов не определяли.

^a Молекулярную массу определяли с помощью ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry) – масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией.

^b Молекулярную массу определяли с помощью MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry) – масс-спектрометрии с лазерной десорбцией и ионизацией, приведены значения $[M + H]^+$.

вание наряду с димерными формами окситоцина соответствующих олигомеров, которые могут необратимо сорбироваться на хроматографических сорбентах, или, вследствие эксклюзии, не дают четких пиков и поэтому не были зарегистрированы в использованных нами условиях ВЭЖХ. Анализ реакционной смеси получения окситоцина при концентрации 10 мг/мл ($\approx 10^{-2}$ М) с помощью масс-спектрометрии подтвердил образование в данных условиях не только окситоцина и его димера, но и три- и тетрамеров (см. рис. 2). Следует отметить, что в этом случае не наблюдается корреляции между соотношениями целевого и побочных продуктов на хроматограммах ВЭЖХ (см. табл. 2) и масс-спектрограмме (рис. 2).

В литературе встречаются отдельные упоминания о том, что введение органических растворителей в состав реакционных смесей при замыкании S–S-мостиков способствует образованию внутримолекулярных дисульфидов [4]. Это подтверждается и вышеприведенными результатами

по синтезу соматостатина-(1–14). Поэтому мы попытались провести циклизацию окситоцина в органической среде, тем более что растворимость его линейного предшественника в водном растворе с pH 6.5–8.5 заметно уменьшается. Использование в качестве растворителя метанола в этом случае оказалось невозможным из-за низкой растворимости линейного пептида в условиях окисления. Удовлетворительные результаты были получены при проведении циклизации в смеси *N,N*-диметилформамида и метанола в соотношении 1 : 5. Из табл. 2 видно, что в этом случае с увеличением концентрации линейного пептида до 10 мг/мл ($\approx 10^{-2}$ М) качество реакционной смеси падает не столь значительно, и содержание окситоцина составляет 71.6%; также не наблюдается резкого снижения площади пика, соответствующего окситоцину.

Линейный дитиольный предшественник октреотида очень ограниченно растворим в водных средах с pH 6.5–8.0 даже при концентрации

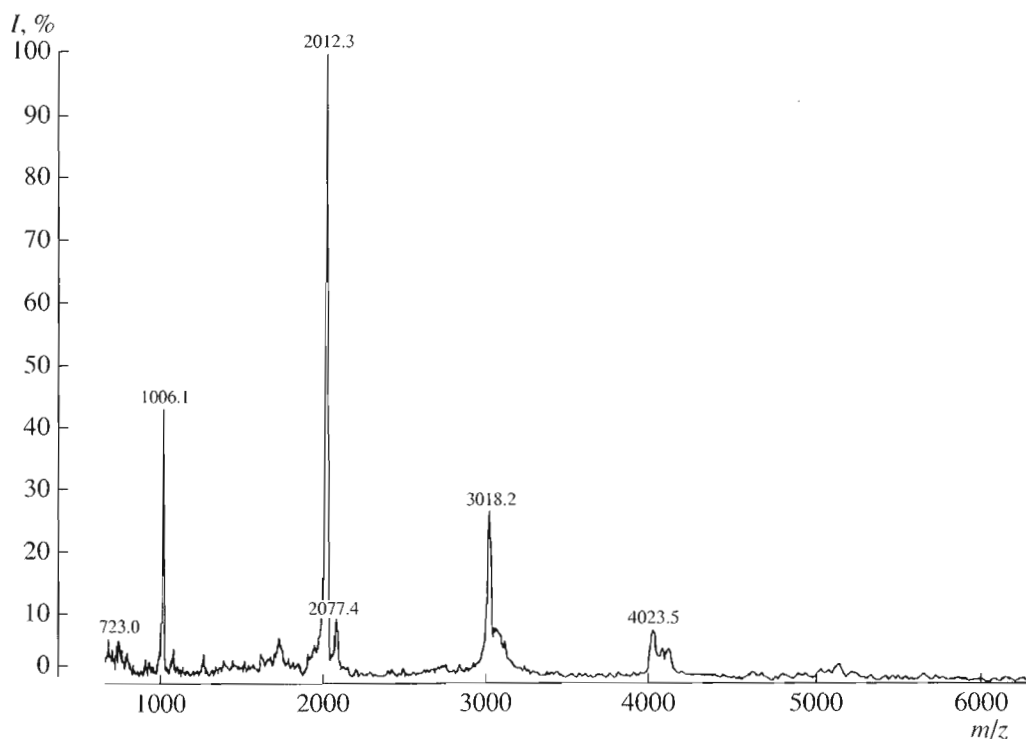


Рис. 2. Масс-спектр реакционной смеси получения окситоцина при концентрации $[\text{Cys}(\text{SH})_2]$ -предшественника 10 мг/мл в водной среде с рН 7.2. Рассчитанная молекулярная масса окситоцина – 1007.7. По оси абсцисс приведены значения $[M + H^+]$.

1 мг/мл, поэтому в данном случае невозможно провести сравнительную оценку результатов его циклизации в водных и органических растворителях. Так, В. Бауер и Дж. Плесс [18] для замыкания S–S-мостика в октреотиде использовали условия высокого разбавления (0.25 мг/мл) в смеси диоксан–вода. Циклизация линейного предшественника октреотида в метаноле проходила неожиданно гладко без заметного образования побочных олигомеров в широком интервале концентраций от 1 до 100 мг/мл (см. рис. 3). Содержание целевого продукта в реакционной смеси менялось незначительно от 98 до 93% (табл. 2), не наблюдалось также заметного снижения площади пика (не более 5–10%), соответствующего октреотиду, в пробах реакционных смесей окисления, приведенных к одинаковой концентрации (ВЭЖХ). В настоящий момент трудно дать объяснение этому интересному факту. Можно лишь предположить, что отсутствие межмолекулярных взаимодействий при таких высоких концентрациях пептида связано с образованием в метаноле компактной конформации молекулы октреотида, способствующим преимущественному замыканию внутримолекулярного S–S-мостика. Анализ реакционной смеси получения октреотида при концентрации 10 мг/мл с помощью масс-спектрометрии (рис. 4) показал, что основным продуктом окисления в этих условиях является целевой циклический пептид, а соответ-

ствующие олигомеры присутствуют в незначительных количествах.

Концентрация 10 мг/мл была выбрана в качестве рабочей и использовалась при получении окситоцина и октреотида в среде органических растворителей, исходя из 20 г исходных линейных дитиолов (см. “Эксперимент. часть”). Однако, если при проведении модельных опытов по циклизации окситоцина и октреотида, результаты которых представлены в табл. 2, соответствующие линейные предшественники были хроматографически очищены до чистоты >95% (по ВЭЖХ), то при проведении крупномасштабных синтезов этих пептидов мы использовали соответствующие линейные Acm- и SH-производные без какой-либо предварительной очистки, поэтому содержание основного вещества в исходных SH-полупродуктах составляло 74 для окситоцина и 82% для октреотида (по ВЭЖХ). Выходы окситоцина и октреотида в данном случае составили 44 и 64% соответственно.

Таким образом, проведенные нами исследования показали преимущества применения перекиси водорода для создания дисульфидных связей в природных пептидах различного строения. На примере окситоцина и октреотида разработана хорошо воспроизводимая технологичная методика окисления пептидных тиолов в соответствующую

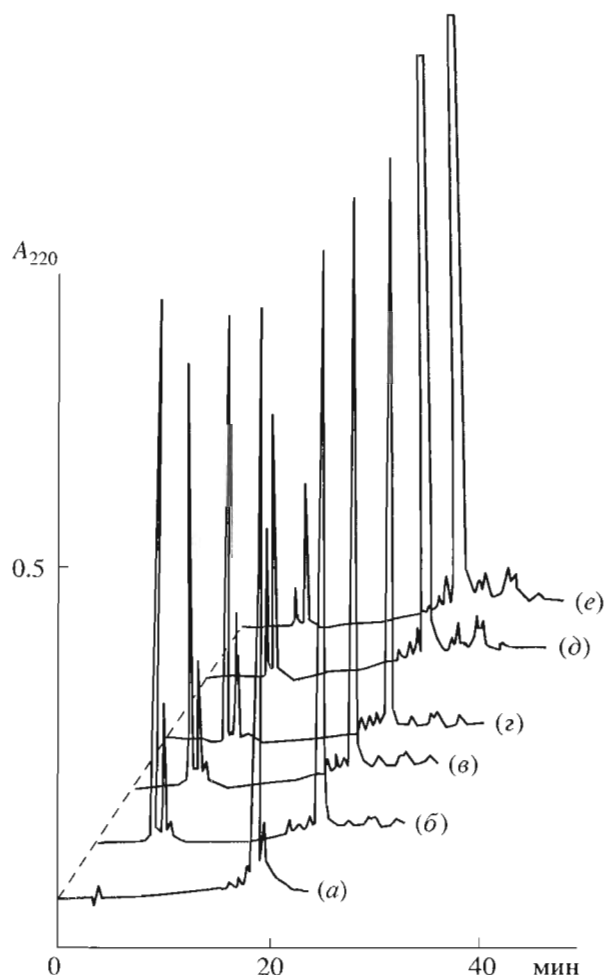


Рис. 3. Аналитическая ВЭЖХ [Cys(SH)₂]-предшественника октреотида (а) и реакционных смесей его окисления с помощью перекиси водорода в метаноле при концентрациях пептида – 1 (б), 10 (в), 20 (г), 50 (д) и 100 мг/мл (е). Колонка – Ultrasphere ODS (4.6 × 250 мм), 5 мкм. Элюирование градиентом от 10 до 70% буфера Б в буфере А за 30 мин.

щие дисульфиды с помощью перекиси водорода в органических растворителях при высоких концентрациях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы производные *L*-аминокислот (Bachem, Швейцария), фенол (Merck, Германия), ацетат ртути, анисол, *n*-крезол, тиофенол, EDT, DIC, НОВt, βMpa, *D*-фенилаланин, *D*-триптофан (Fluka, Швейцария), 50% перекись водорода (Solvay Interlox, Бельгия). Перед проведением реакций окисления перекись водорода разбавляли деионизованной водой до нужной концентрации и титровали 1 н. раствором КМnO₄. Для твердофазного синтеза пептидов применяли *N*-метилпирролидон, дихлорметан, пиперидин, метанол и триф-

торуксусную кислоту фирмы Applied Biosystems GmbH (Германия). Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе фирмы Gilson (Франция), использовали колонки Ultrasphere ODS, 5 мкм (4.6 × 250 мм) (Beckman, США), в качестве элюентов применяли буфер А – 0.05 М КН₂РO₄, рН 3 и буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А, и Vydac C18, 5 мкм, размер пор 300 Å (4.6 × 250 мм) (Sigma, США), в качестве элюентов использовали буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Скорость потока 1 мл/мин, детекция при 220 нм. Препаративную ВЭЖХ проводили на приборе Beckman Prep 350 (США), колонка диасорб-130-С16Т ЗАО “Биохиммак СТ” (РФ), 10 мкм, детекцию – при длине волны 226 нм. Для элюции циклических дисульфидов пептидов применяли градиент буфера А в буфере Б, буфер А – 0.01 М ацетат аммония рН 4.5, Б – 80% ацетонитрил. Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил фирмы Techporpharm (РФ).

Для аминокислотного анализа пептиды гидролизовали 6 н. НСl, содержащей 2% тиогликолевой кислоты 24 или 48 ч при 110°C. Аминокислотный состав гидролизатов определяли на автоматическом анализаторе Biotronik 5001 (Германия). Масс-спектры регистрировали на квадрупольном масс-спектрометре Finnigan MAT TSQ 700 (Германия) с электроспрейным (API) ионным источником (Finnigan MAT) (США) – ESI-MS и масс-спектрометре Analytical Compact MALDI 4 фирмы Kratos (Англия) – MALDI-MS. В работе использовали азот (в баллонах) марки “ос. ч.” (РФ).

Твердофазный синтез пептидов. Синтез пептидов проводили на автоматическом пептидном синтезаторе Applied Biosystems, модель 431А. При использовании Fmoc-технологии твердофазный синтез линейных Acst-предшественников пептидов Р4, АРЦ_r, АРШ_r, α-ANF_r и соматостатина-(1–14) проводили каждый раз исходя из 0.25 ммоль соответствующего Fmoc-аминоацилполимера фирмы Bachem (Швейцария). Содержание стартовых аминокислот в соответствующих Fmoc-аминоацилполимерах составляло 0.5–0.7 ммоль/г. В качестве полимерного носителя использовали сополимер стирола с 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой (полимер Ванга). Аминокислотную цепь наращивали по стандартным программам для однократной конденсации Fmoc-аминокислот. Синтетический цикл включал 20-минутную активацию 1 ммоль присоединяемой аминокислоты в присутствии эквивалентных количеств DIC и НОВt в NMP, деблокирование α-аминогрупп 20% раствором пиперидина в NMP в течение 20 мин, конденсацию с 1 ммоль (4-кратным избытком) ацилирующего агента в NMP в течение 90 мин и все необходимые промежуточные промывки пептидилполимера.

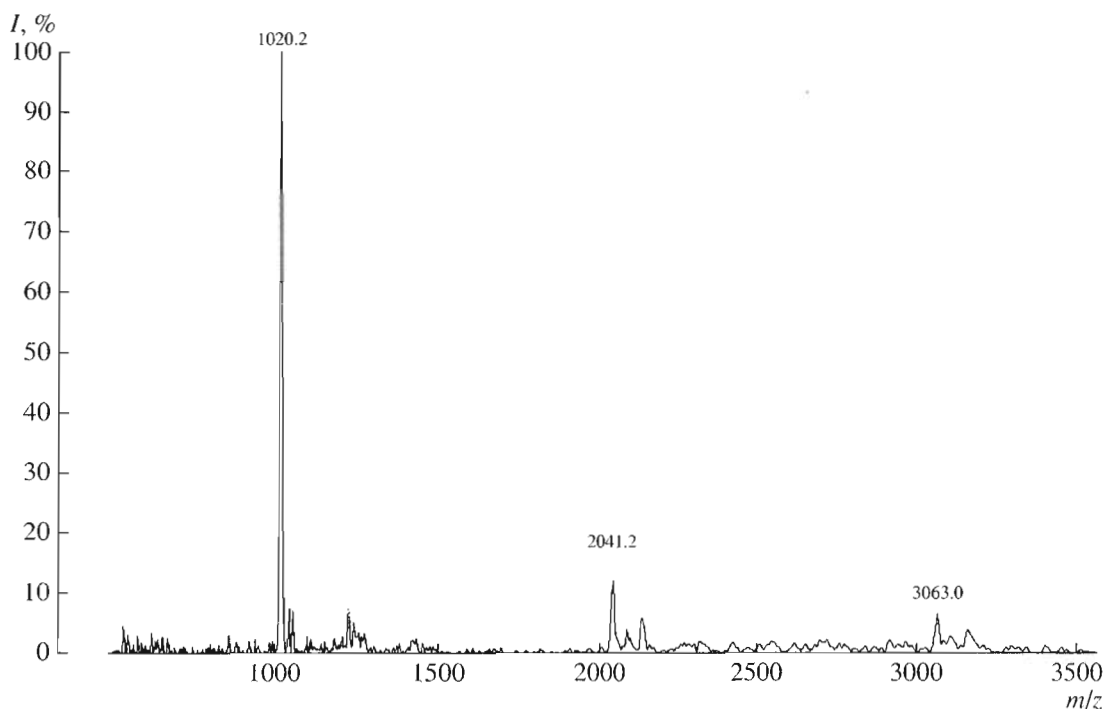


Рис. 4. Масс-спектр реакционной смеси получения октреотида при концентрации $[\text{Cys}(\text{SH})_2]$ -предшественника 10 мг/мл в метаноле. Рассчитанная молекулярная масса октреотида – 1019.3. По оси абсцисс приведены значения $[M + H^+]$.

По окончании твердофазного синтеза N^α -деблокированные пептидилполимеры суспендировали в 10 мл смеси, содержащей 82.5% TFA, 5% фенола, 5% H_2O , 5% тиоанизола, 2.5% EDT и перемешивали 2 ч при 25°C. Полимер отфильтровывали, промывали TFA (3×1 мл), фильтрат упаривали до объема ≈ 1 мл, к остатку прибавляли сухой эфир, осадок отфильтровывали, промывали эфиром, этилацетатом, сушили. Полученные $[\text{Cys}(\text{AcM})_2]$ -производные пептидов P4, APII, APIII, α -ANF_I и соматостатина-(1–14) растворяли в 10% AcOH и хроматографировали порциями по 0.15–0.20 г на колонке (25×250 мм) с диасорбом. Элюирование пептидов проводили в градиенте буфера Б (0.5% в 1 мин, от 10 до 50%) в буфере А; буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрил. Скорость элюции 12 мл/мин. Фракции, содержащие целевые продукты, объединяли, упаривали, растворяли в воде и лиофилизовали.

Методики прямой конверсии $[\text{Cys}(\text{AcM})_2]$ -предшественников пептидов в циклические дисульфиды с помощью йода [6, 10, 11, 19, 20], деблокирования остатков цистеина и последующего замыкания S–S-мостиков с помощью перекиси водорода [6, 10, 11] описаны нами ранее и были использованы для получения пептидов P4, атриальных пептидов и соматостатина-(1–14) (табл. 1), см. также приведенную ниже методику циклизации аналога вазопрессина. Выходы и характеристики

циклических пептидов, впервые полученных нами с использованием перекиси водорода, представлены в табл. 1 и 3. Содержание пептидного материала в лиофилизатах циклических продуктов, определенное с помощью количественного аминокислотного анализа, составляло от 82 до 90%.

β Mpa-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂
 (**$[\beta$ Mpa¹,Arg⁸]вазопрессин**). 0.2 г (0.16 ммоль) β Mpa(AcM)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(AcM)-Pro-Arg-Gly-NH₂ растворяли в смеси 15 мл AcOH и 5 мл метанола, добавляли 0.2 г (0.64 ммоль) ацетата ртути, перемешивали 1.5 ч при 20°C и пропускали ток сероводорода 30 мин. Осадок отфильтровывали, промывали 15 мл смеси AcOH–метанол (2 : 1). Фильтрат упаривали до объема ~ 2 мл и добавляли 20 мл этилацетата. Осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, гексаном и высушивали. Полученный дитиол растворяли в 150 мл воды, прибавляли 25% раствор аммиака до pH 8.0 и 3 мл (1.6 ммоль) разбавленного и оттитрованного раствора перекиси водорода. Смесь перемешивали 30 мин, контролируя образование S–S-мостика при помощи ВЭЖХ. В реакционную смесь прибавляли 2 мл AcOH, упаривали до объема 50 мл и хроматографировали на колонке (25×250 мм) с диасорбом. Элюирование проводили в градиенте буфера Б (1% в мин, от 20 до 60%) в буфере А со скоростью потока 12 мл/мин.

Фракции, соответствующие целевому продукту, объединяли, упаривали, остаток растворяли в воде и лиофилизировали. Выход 0.13 г (81.0%). Масс-спектр (MALDI-MS): найдено m/z – 1068.0 ($[M + H^+]$), вычислено 1069.24 для $C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$. Аминокислотный анализ: Asx 1.01(1), Glx 1.10(1), Gly 1.00(1), Tyr 0.88(1), Phe 1.01(1); содержание пептида в лиофилизате – 88%. Чистота полученного соединения – 98.0% по данным ВЭЖХ.

H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂

(окситоцин). 20 г неочищенного трифторацетата H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂ (содержащего 74% основного вещества по данным ВЭЖХ) растворяли в 2 л смеси DMF и метанола (1 : 5), добавляли 6 мл 25% раствора аммиака до pH 7.5–8 и 6 мл (53.0 ммоль) раствора перекиси водорода, выдерживали 1 час при 25°C (полноту протекания реакции контролировали с помощью ВЭЖХ). Реакционную смесь подкисляли AcOH до pH 4, упаривали при 30°C до объема 200 мл, к остатку добавляли эфир, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 1.0 л 3% уксусной кислоты и хроматографировали на колонке (50 × 250 мм) с диасорбом. Пептид элюировали в градиенте Б (0.3% в мин, от 10 до 50%) в А со скоростью потока 50 мл/мин. Получено 6.2 г (47%) окситоцина. Масс-спектр (MALDI-MS): найдено m/z – 1007.7 ($[M + H^+]$), вычислено 1007.2 для $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$. Аминокислотный анализ: Asx 0.98(1), Glx 1.08(1), Gly 1.00(1), Ile 0.90(1), Leu 0.80(1), Tyr 0.84(1); содержание пептида в лиофилизате – 94%. Чистота полученного соединения по данным ВЭЖХ – 97.0%.

H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-NH-CH-

[CH(OH)CH₃]-CH₂OH (октреотид). 20 г неочищенного трифторацетата H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-треонинола (“сырого” продукта синтеза, содержащего 82% основного вещества по данным ВЭЖХ) растворяли в 2 л метанола, добавляли 6 мл 25% раствора аммиака до pH 7.5–8 и 6 мл (53.0 ммоль) раствора перекиси водорода, выдерживали 1 ч при 25°C (полноту протекания реакции контролировали с помощью ВЭЖХ*). Реакционную смесь подкисляли AcOH до pH 4, упаривали при 30°C до объема 1 л, добавляли 1.0 л воды, метанол упаривали, остаток хроматографировали на колонке (50 × 250 мм) с диасорбом. Пептид элюировали градиентом Б (0.3% в мин, от 20 до 60%) в А со скоростью потока 50 мл/мин. Получено 8.6 г (64%) октреотида. Масс-спектр (MALDI-MS): найдено m/z – 1020.3 ($[M + H^+]$), вычислено 1019.3 для $C_{49}H_{66}N_{10}O_{10}S_2$. Аминокислотный анализ: Thr 0.87(1), Phe 2.01(2), Trp 0.69(1), Lys 1.03(1); содержание пептида в

лиофилизате – 87%. Чистота полученного соединения по данным ВЭЖХ – 98.2%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andreu D., Albericio F., Sole N.A., Munson M.C., Ferrer M., Barany G. // Peptide Synthesis Protocols / Eds Pennington W., Dunn M.B. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1994. P. 91–169.
2. Сидорова М.В., Кудрявцева Е.В., Евстигнеева Р.П. // Успехи химии. 1998. Т. 67. С. 611–630.
3. Hardy P.M., Ridge B., Rydon H.N., dos S.P. Serrão F.O. // J. Chem. Soc. (C). 1971. P. 1722–1731.
4. Moroder L., Besse D., Musiol H.-J., Rudolph-Bohner S., Siedler F. // Biopolymers. 1996. V. 40. P. 207–234.
5. Misicka A., Hruby V.J. // Polish J. Chem. 1994. V. 68. P. 893–899.
6. Kudryavtseva E.V., Sidorova M.V., Ovchinnikov M.V., Bepalova Zh.D., Bushuev V.N. // J. Peptide Res. 1997. V. 49. P. 52–58.
7. Кудрявцева Е.В., Сидорова М.В., Молокочедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 107–116.
8. Кудрявцева Е.В., Сидорова М.В., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н., Евстигнеева Р.П. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 370–375.
9. Пансевич О.С., Чипенс Г.И., Михайлова С.В. Нейрогипофизарные гормоны. Рига: Зинатне, 1986.
10. Сидорова М.В., Кудрявцева Е.В., Молокочедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 675–683.
11. Сидорова М.В., Кудрявцева Е.В., Антопольский М.Л., Палькеева М.Е., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 273–279.
12. Eichler J., Houghen R.A. // Protein Peptide Lett. 1997. V. 4. P. 157–164.
13. Kudryavtseva E.V., Sidorova M.V., Ovchinnikov M.V., Bepalova Zh.D. // J. Peptide Science. 2000. V. 6. P. 208–216.
14. King D.S., Fields C.G., Fields G.B. // Int. J. Peptide Protein Res. 1990. V. 36. P. 255–266.
15. Hope D.V., Murti V.V.S., du Vigneaud V. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. P. 1563–1566.
16. McCurdy S.N. // User Bulletin Peptide Synthesizer Applied Biosystems. 1988. № 25.
17. Kumagaye S.-I., Kuroda H., Nakajima K., Watanabe T.X., Kimura T., Masaki T., Sakakibara S. // Int. J. Peptide Protein Res. 1988. V. 32. P. 519–526.
18. Bauer W., Pless J. Eur. Pat. Appl. 29, 579 (1981); US. pat. 4, 395, 403 (1983).
19. Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д., Молокочедов А.С., Титов М.В., Ревенко И.В., Виноградов В.А., Коробов Н.В., Жуковский С.В. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. С. 777–782.
20. Ovchinnikov M.V., Bepalova Z.D., Molokoedov A.S., Titov M.I., Revenko I.V., Vinogradov V.A., Korobov N.V., Zhukovskii S.V. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1989. V. 54. P. 796–802.

*По данным ВЭЖХ, содержание октреотида в реакционных смесях в разных опытах колебалось от 70 до 75%.

The Use of Hydrogen Peroxide for Closing Disulfide Bridges in Peptides

M. V. Sidorova^{##}, A. S. Molokoedov^{*}, A. A. Az'muko^{*}, E. V. Kudryavtseva^{*},
E. Krause^{**}, M. V. Ovchinnikov^{*}, and Zh. D. Bespalova^{*}

[#] Phone: +7 (095) 414-6716; fax: +7 (095) 414-6786; e-mail: peptide@cardio.ru

^{*}Cardiological Research and Production Association, Russian Ministry of Health,
ul. Tret'ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia

^{**}Institute of Molecular Pharmacology, Berlin, Germany

The use of hydrogen peroxide for the formation of disulfide bridges was studied in 15 peptides of various lengths and structures. The oxidation of peptide thiols by hydrogen peroxide was shown to proceed under mild conditions without noticeable side reactions of Trp, Tyr, and Met residues. Yields of the corresponding cyclic disulfides were high and mostly exceeded those obtained with other oxidative agents, in particular, iodine. It was established that the use of hydrogen peroxide in organic medium also provided sufficiently high yields when large-scale syntheses of oxytocin and octreotide (up to 10 g) were carried out. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: chemical synthesis, disulfide bond, hydrogen peroxide, natural peptides and their analogues