



УДК 611-018.74

НАПРАВЛЕННОЕ И СПОНТАННОЕ ЗАМЫКАНИЕ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ С ПОМОЩЬЮ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В СИНТЕЗЕ ЭНДОТЕЛИНОВ-1 И -3

© 1999 г. Е. В. Кудрявцева[#], М. В. Сидорова, А. С. Молокеедов,
М. В. Овчинников, Ж. Д. Беспалова

Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России,
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

Поступила в редакцию 11.03.98 г. Принята к печати 16.06.98 г.

Линейные предшественники эндотелинов-1 и -3 получены с использованием Вос- и Fmoc-схем твердофазного синтеза пептидов. Проведена сравнительная оценка направленного и спонтанного замыкания дисульфидных мостиков при получении эндотелинов-1 и -3 – природных вазоактивных пептидов с двумя дисульфидными связями в молекуле. Показано, что оба способа дают сравнимые результаты. Подобраны условия, позволяющие замыкать S–S-мостики в метионинсодержащем эндотелине-1 с помощью перекиси водорода без окисления метионина до соответствующего сульфоксида.

Ключевые слова: эндотелины-1 и -3; пептиды, твердофазный синтез; дисульфидные связи, направленное и спонтанное замыкание; перекись водорода.

Для создания S–S-мостиков при синтезе полидисульфидсодержащих пептидов существуют две стратегии: направленное и спонтанное замыкание S–S-связей. Первый способ предполагает комбинацию ортогональных* защитных групп [1] тиольных функций соответствующих пар остатков цистеина и избирательных методов деблокирования/окисления; при этом дисульфидные мостики образуются в заданном положении. При реализации второго способа, после деблокирования SH-функций цистеина, замыкание всех дисульфидных связей осуществляют одновременно. Спонтанная циклизация политиолсодержащих пептидов обычно сопровождается получением смеси дисульфидных изомеров, но иногда она протекает с высокой степенью региоселективности [2, 3]. Несмотря на относительно низкие выходы целевых полидисульфидов (обычно не превышающие

10%), этот способ применялся для синтеза сложных соединений, в том числе инсулина [3].

Данная работа – продолжение наших исследований в области синтеза пептидов, содержащих дисульфидные связи [4–7]. Сравнительная оценка различных окислителей (O₂, I₂, K₃[Fe(CN)₆], H₂O₂) для образования S–S-мостиков в природных цистеинсодержащих пептидах показала, что в большинстве случаев перекись водорода имеет ряд преимуществ [5, 7]. Нам представлялось интересным рассмотреть возможность применения H₂O₂ в синтезе более сложных структур – пептидов с двумя дисульфидными связями. В качестве объектов были выбраны эндотелины-1 и -3 (ЕТ-1 и ЕТ-3), обладающие вазоактивными свойствами [8].

Мы провели сравнительную оценку направленного и спонтанного замыкания S–S-связей с помощью перекиси водорода в синтезе эндотелинов-1 и -3. Поставленная задача предполагает решение вопроса о возможности применения H₂O₂ для создания S–S-мостиков в метионинсодержащих пептидах, поскольку ЕТ-1 содержит метионин, особенно чувствительный к окислению.

Для направленного замыкания S–S-связей линейные предшественники эндотелинов-1 и -3 были синтезированы с помощью Вос- и Fmoc-схем твердофазного синтеза. Синтез линейных производных эндотелинов по Вос-схеме проводили на сополимере стирола и 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфенилацетамидометильной якорной группой (РАМ-полимер). Для защиты тиольных функций остатков цистеинов применяли ортого-

Использованы сокращения, рекомендованные комиссией IUPAC-IUB (Eur. J. Biochem. 1984. V. 183. P. 9–37), а также: Asp – ацетамидометил; DCM – дихлорметан; DIC – N,N'-ди-изопропилкарбодимид; DTNB – 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная) кислота; EDT – 1,2-этандитиол; ESI-MS – масс-спектрометрия с электроспрейным ионным источником; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; For – формил; HOBt – 1-гидроксисбензотриазол; Meb – 4-метилбензил; Mob – 4-метоксисбензил; NMP – N-метилпирролидон; ET – эндотелин.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 414-67-16; e-mail: sag@mail.infotel.ru; факс: (095) 414-67-86).

* Защитные группы различных классов, каждая из которых может быть избирательно удалена в присутствии других, причем это удаление может быть произведено в любом порядке.

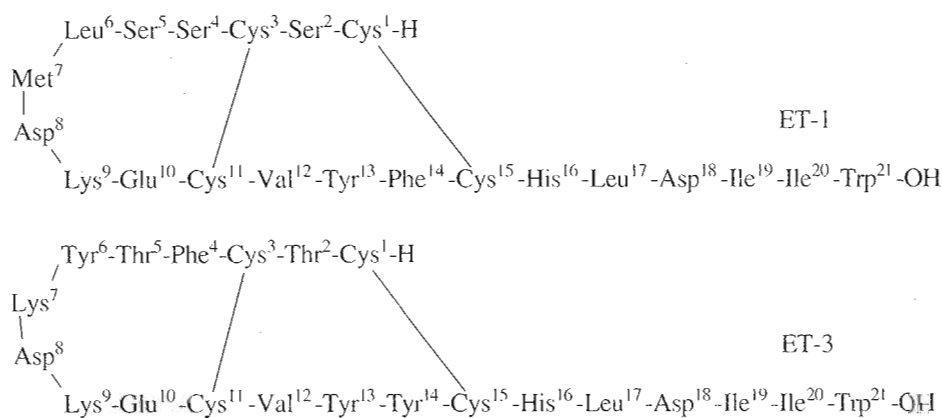
Таблица 1. Окисление [Met]-энкефалина 1.5 экв. перекиси водорода* в течение 5 мин. Показано содержание Met(O)-производного пептида по данным ВЭЖХ

pH	3.0–4.0	4.0–5.0	7.5–8.0	8.5–9.0
%	44.2	14.0	7.5	2.8

* Концентрация пептида в растворе составляла 1 мг/мл.

нальные защитные группы: ацетамидометильную, устойчивую к действию фтористого водорода [1, 2], для Cys^{1,15} и 4-метилбензильную [1, 2, 9] (в случае ET-1) или 4-метоксибензильную [1, 9] (в случае ET-3), отщепляемые фтористым водородом, для Cys^{3,11}. Подобная комбинация защитных

групп неоднократно применялась в синтезе пептидов с двумя дисульфидными связями, в том числе и эндотелина-1 [2, 3]. Для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот использовались следующие защиты: *Bzl* – для карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот, гидроксильных функций серина и треонина, *Dnp* – для имидазольного кольца гистидина, *For* – для индольного кольца триптофана, 2,6-дихлорбензильную – для гидроксильной функции тирозина, 2-хлорбензилоксикарбонильную – для ε-аминогруппы лизина. Для образования амидной связи применяли DIC/NOBt-метод. По окончании синтеза *Dnp*-защиту удаляли тиолизом с помощью тиофенола [10].



Отщепление пептидов от полимера осуществляли жидким HF при 0°C в присутствии *n*-крезола [2]. В процессе этой обработки удалялись также все боковые защитные группы аминокислот, кроме *Asn* и *For* (рис. 1а). Содержание основного вещества – производных линейных предшественников ET-1 и ET-3 (соединения (I) и (II) на рис. 1а соответственно) – в сырых продуктах твердофазного синтеза было относительно низким и составило 31 и 29% соответственно. Возможно, это вызвано тем, что необходимость сохранения Nⁱⁿ-*For*-защиты триптофана не позволяет использовать при обработке HF пептидилполимеров наиболее эффективные для улавливания образующихся карбокатионов серосодержащие катионные ловушки (скэвенджеры) из-за склонности формильной группы к отщеплению в присутствии тиолов [11]. Линейные производные пептидов ET-1 и ET-3 растворяли в 8 М мочеvine, необходимой для предотвращения агрегации линейных предшественников эндотелина в водных растворах [2, 12] и подвергали циклизации действием перекиси водорода описанными ниже методами.

Известно, что метионинсодержащие пептиды легко окисляются с образованием соответствующих Met(O)-производных даже кислородом воздуха [1]. Кроме того, метионин в кислых условиях

в присутствии 1–2 экв. H₂O₂ превращается в сульфоксид в течение нескольких секунд. Поэтому замыкание дисульфидных связей в метионинсодержащих пептидах с помощью перекиси водорода представляется проблематичным [13]. Мы провели опыты по изучению чувствительности метионина к действию H₂O₂ при различных значениях pH на модельном пептиде – [Met]-энкефалине (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH) (табл. 1). Окисление метионина до соответствующего сульфоксида существенно замедляется при щелочных значениях pH. Поэтому мы предположили, что нежелательное окисление метионина при замыкании S–S-мостиков с помощью H₂O₂ можно свести к минимуму, если проводить циклизацию при pH > 8.0 с последующим удалением остаточной перекиси водорода из реакционной массы (перед подкислением раствора до pH 3.0–4.0). Было найдено, что барботирования реакционной смеси азотом или гелием в течение 20 мин перед подкислением было достаточно для предотвращения образования Met(O)-производного.

Полученные в модельных опытах результаты были использованы при синтезе эндотелина-1. Для замыкания внутреннего S–S-мостика линейное производное эндотелина-1 (соединение (I) на рис. 1а) обрабатывали 1–2 экв. перекиси водорода

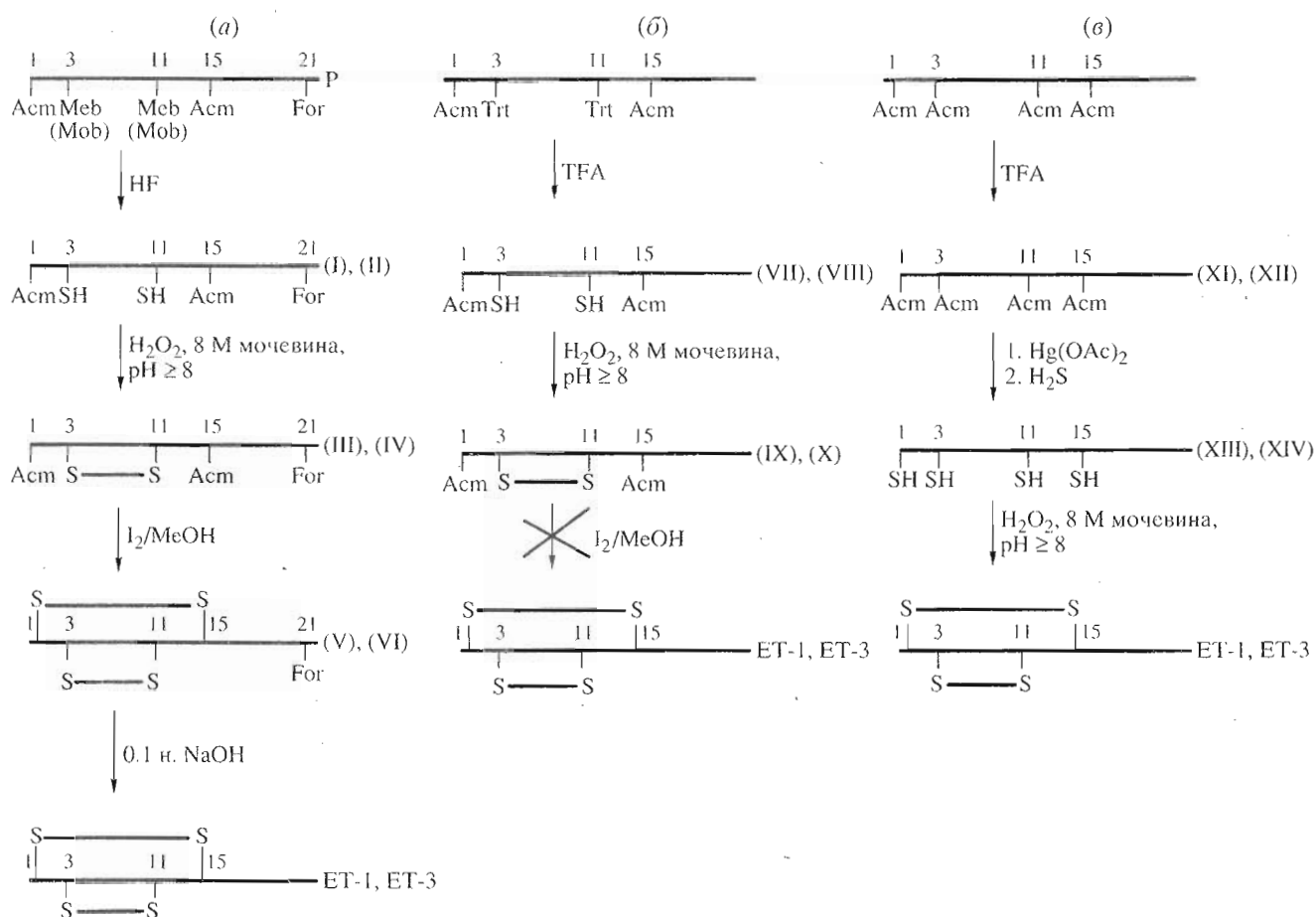


Рис. 1. Схемы синтеза эндотелинов-1 и -3. Твердофазный синтез линейных предшественников с использованием Вос-схемы (а), Фмос-схемы – (б) и (в). Использованы направленный (а, б) и спонтанный (в) способы замыкания дисульфидных связей.

при $\text{pH} \geq 8.0$ в 8 М растворе мочевины. После завершения окисления (контроль методом ВЭЖХ) реакционную массу барботировали инертным газом в течение 20–30 мин. Отсутствие H_2O_2 контролировали йодометрической пробой, после чего pH доводили до 4–5. Реакционную смесь хроматографировали на колонке Vydac C18. Выделенный моноциклический полупродукт (соединение III) на рис. 1а) практически не содержал сульфоксида метионина, что было подтверждено результатами ВЭЖХ (рис. 2) и ESI-масс-спектрометрией (рис. 3). Следует отметить, что подкисление реакционной смеси без предварительного барботирования гелием или азотом быстро и практически полностью приводило к образованию соответствующего Met(O)-производного, что было подтверждено данными ВЭЖХ и ESI-MS.

Для синтеза моноциклического производного ET-3 (соединение IV) на рис. 1а), не содержащего в последовательности остатка метионина, использовали ранее описанную методику циклизации с применением 2–5-кратных избытков H_2O_2 при pH 7–8 в 8 М мочевины [5, 7].

Замыкание внешнего дисульфидного мостика между остатками Cys¹ и Cys¹⁵ в соединениях III и IV проводили йодом в водном метаноле [2]. После обессоливания целевых продуктов препаративной ВЭЖХ были получены бициклические

Таблица 2. Выходы целевых веществ и полупродуктов в синтезе эндотелинов-1 и -3

Эндотелины	ET-1	ET-3
Выход моноциклических производных III и IV на стартовую аминокислоту, %	17	9
Чистота моноциклических производных III и IV, ВЭЖХ*, %	96	97
Выход ET-1 и ET-2 в расчете на соединения III и IV, %	39	40
Чистота, ВЭЖХ*, %	97	99
Суммарный выход на стартовую аминокислоту, %	7	4

* Аналитическая ВЭЖХ на колонке Vydac C18 (4.6 × 250 мм).

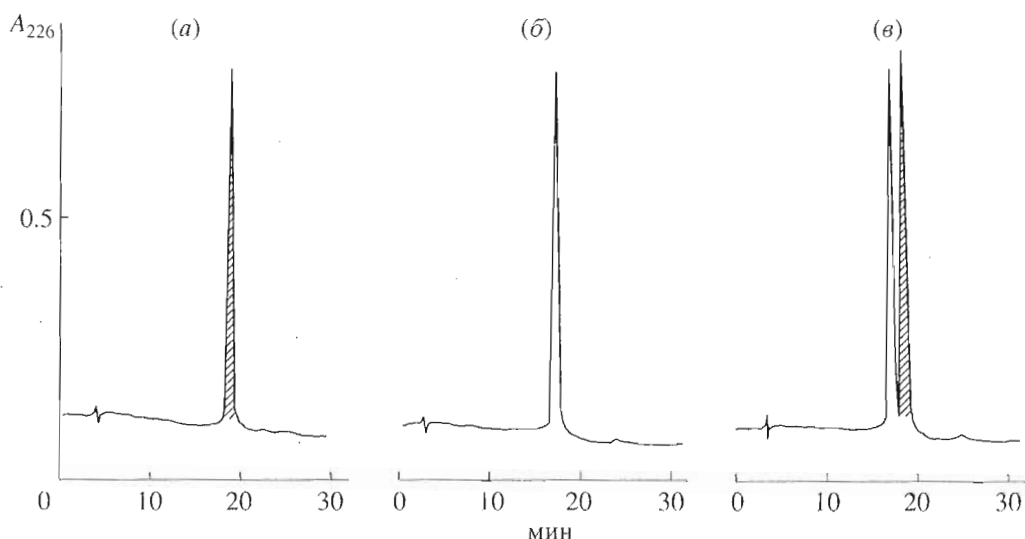


Рис. 2. Аналитическая ВЭЖХ соединения (III) – моноциклического полупродукта при получении ET-1 (а), соответствующего Met(O)-производного (б) и их искусственной смеси (в). Колонка Vydac C18 (4.6 × 250 мм), градиент (1) (см. “Эксперимент. часть”).

Trp(For)-производные эндотелинов (соединения (V) и (VI) на рис. 2а) 96–99% чистоты. Nⁱⁿ-формильную группу удаляли действием 0.1 н. NaOH с последующим обессоливанием ВЭЖХ. В результате были получены ET-1 и ET-3 высокой степени чистоты (табл. 2).

Поскольку синтез линейных производных эндотелинов (соединения (I) и (II)) с применением Вос-схемы не позволил достичь содержания основного вещества в сырых продуктах более 31%, мы решили осуществить синтез линейных предшественников (соединения (VII) и (VIII) на рис. 1б) с использованием Fmoc-схемы, которая обеспечивает более мягкие условия синтеза пептидов и отщепления их от полимеров [14]. Наши исследова-

ния по окислению йодом триптофансодержащих пептидов с незащищенным индольным кольцом позволили предположить, что циклизацию можно провести с достаточно высоким выходом при соблюдении определенных условий [6, 7].

Синтез линейных производных эндотелинов по Fmoc-схеме проводили на сополимере стирола и 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой (смола Ванга) с использованием DIC/NOBt-метода. Для защиты тиольных функций цистеинов применяли ортогональные защитные группы Acst – для Cys^{1,15} и Trt – для Cys^{3,11}. Для блокирования функциональных групп серина, треонина, тирозина, аспарагиновой и глутаминовой кислот были выбраны защиты *трет*-бутильного типа, Вос – для ε-аминогруппы лизина и Trt – для гистидина. По окончании синтеза пептидилполимер обрабатывали реагентом К [15], хорошо зарекомендовавшим себя при отщеплении пептидов от полимера. Содержание основных веществ – линейных предшественников эндотелинов-1 и -3 (соединения (VII) и (VIII)) – в сырых продуктах твердофазного синтеза составило 43 и 56% соответственно (по данным ВЭЖХ), что было выше, чем при синтезе по Вос-схеме. Замыкание внутренних дисульфидных мостиков (между Cys³ и Cys¹¹) осуществляли действием H₂O₂ в 8 М мочеvine в условиях, описанных выше (рис. 1б). Выходы моноциклических производных (IX) и (X) (рис. 1б) составили 6 и 23% в расчете на стартовую аминокислоту соответственно.

Замыкание внешних дисульфидных мостиков (между Cys¹ и Cys¹⁵) проводили йодом. При получении ET-1 использовали 15 экв. I₂ в метаноле. Однако в случае ET-3 Acst-защитные группы не уда-

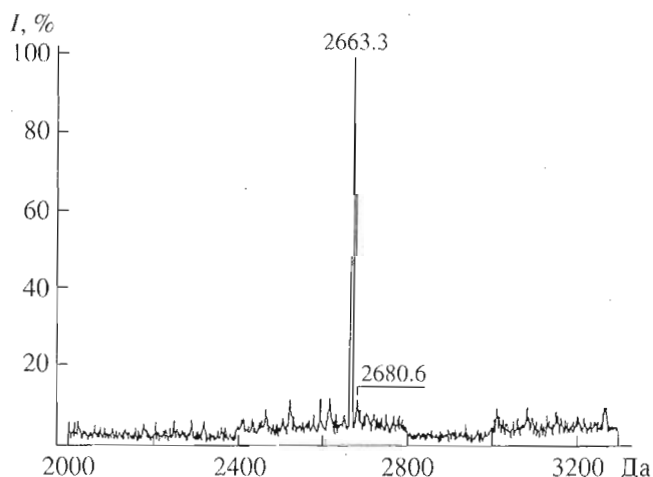


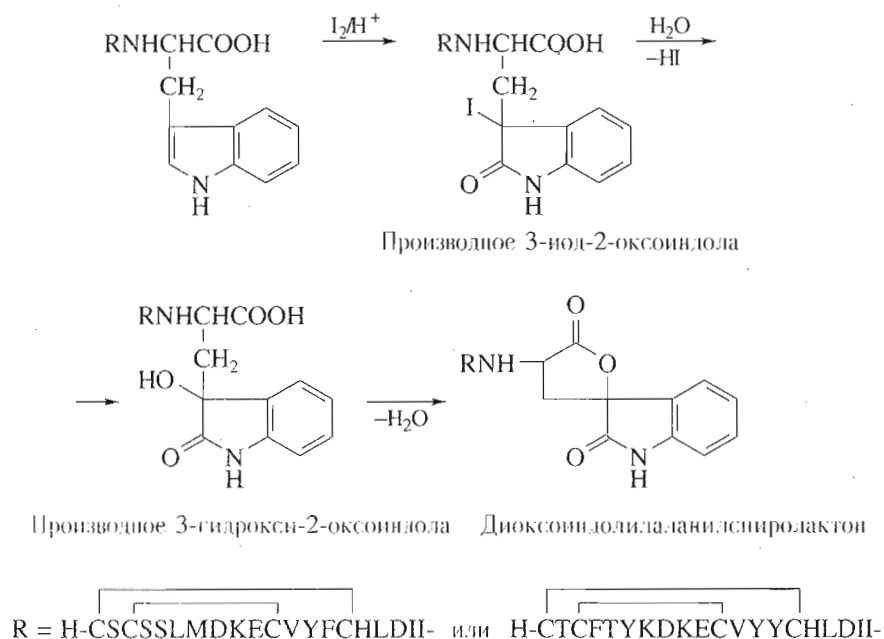
Рис. 3. Масс-спектр соединения (III). Рассчитанная молекулярная масса – 2663.9 Да.

валось удалить полностью в аналогичных условиях, поэтому деблокирование с одновременной циклизацией осуществляли достаточно жестко – действием 30 экв. йода в 80% уксусной кислоте. При этом независимо от применяемого растворителя и в случае ET-1, и в случае ET-3 продукт циклизации, судя по данным ESI-MS, представлял собой смесь целевого и побочного веществ, разделить которые мы не смогли. Соотношение целевой/побочный продукт составляло 40/60% для ET-1 и 30/70% для ET-3. Оба побочных продукта, по-видимому, имели одинаковую природу: их молекулярные массы были больше масс целевых бициклических веществ на 14 Да (M 2492+14 для ET-1 и 2643+14 для ET-3). Данные УФ- (смещение максимума поглощения в длинноволновую область) и ^1H -ЯМР-спектроскопии свидетельствуют о существенной модификации индольного кольца триптофана в обоих случаях. Сопоставление этих данных с литературными [16, 17] позволяет предположить, что побочными продуктами в нашем случае могут быть соответствующие диоксоиндолилаланинспиролактоны, образующиеся из производных 2-оксоиндола (схема).

Спиролактоны получают в результате галогенирования триптофансодержащих пептидов и белков. Обычно это наблюдается при химическом расщеплении белков по остатку триптофана действием таких реагентов как I_2/H^+ , бромциан, NHX (где X – галоид), N -бромсукцинимид [16, 17]. Таким образом, при синтезе ET-1 и ET-3 наличие защиты индольного кольца триптофана – необ-

ходимое условие успеха при замыкании дисульфидных мостиков йодом.

Следующим этапом работы было получение ET-1 и ET-3 с использованием спонтанной циклизации, предусматривающей одновременное замыкание двух дисульфидных мостиков (рис. 1в). Линейные предшественники ET-1 и ET-3 были синтезированы с использованием Fmoc-схемы так же, как соответствующие исходные соединения для направленного замыкания дисульфидных мостиков, однако, в этом случае для блокирования сульфгидрильных функций всех остатков цистеина применяли Асп-группы. Для отщепления пептидов от полимера использовали реагент K [15]. Содержание основного вещества в сырых Асп-производных ET-1 (соединение (XI)) и ET-3 (соединение (XII)) (рис. 1в) составило 58 и 55% (по данным ВЭЖХ) соответственно. Следует отметить исключительно низкую растворимость и высокую склонность к агрегации Асп-защищенных производных ET-1 и ET-3 в водных буферных системах в широком диапазоне pH, что существенно осложняет работу с ними. Для растворения соединений (XI) и (XII) использовали смеси 8 М мочевины и 30–50% AcOH , содержащие 5–10% *n*-бутанола. Их очистку проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонках Vydac C18 или Диасорб С16; при этом последняя давала лучшие результаты. Степень гомогенности соединений (XI) и (XII) после очистки составила 93–97% (по данным ВЭЖХ), а выходы в расчете на стартовую аминокислоту – 31 и 32% соответственно. Линейные производные имели корректный аминокис-



Предполагаемая схема образования побочных продуктов при использовании йода для замыкания дисульфидного мостика между остатками $\text{Cys}^{1,15}$ в ET-1 и ET-3.

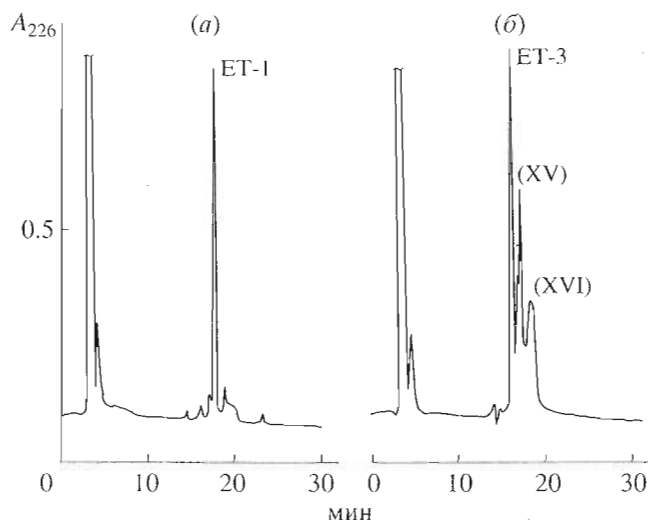


Рис. 4. Аналитическая ВЭЖХ реакционных смесей спонтанного замыкания дисульфидных связей в синтезе ET-1 (а) и ET-3 (б). Колонка Ultrasphere ODS (4.6 × 250 мм), градиент (1).

лотный состав и молекулярную массу по данным аминокислотного анализа и масс-спектрометрии.

Для отщепления Асн-защитных групп применяли ацетат ртути [10]. Ионы ртути удаляли 2-меркаптоэтанолом (20–30-кратный избыток) или сероводородом. Разрушение меркаптидов ET-1 2-меркаптоэтанолом оказалось неэффективным, так как реакционная смесь после окисления по результатам ВЭЖХ практически не содержала ни целевого ET-1, ни соответствующего Met(O)-производного, ни исходного *тетра*-SH-производного ET-1 (соединение (XIII) на рис. 1в). Основным продуктом этой реакции, по-видимому, представлял собой ртутный комплекс пептида, содержащий по данным масс-спектрометрии два атома ртути на молекулу пептида. Этот комплекс удалось разрушить действием сероводорода, поэтому в дальнейших экспериментах для разрушения соответствующих меркаптидов мы применяли сероводород.

Спонтанное замыкание дисульфидных связей в синтезе ET-1 проводили с использованием 2 экв. перекиси водорода при pH 8.5 в 8 М мочеvine, происходящие превращения контролировали с помощью ВЭЖХ и реактива Элмана. В случае ET-1 реакция окисления протекала весьма однозначно, содержание природного изомера в реакционной смеси составляло от 75 до 82% (рис. 4а). Целевой продукт выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ. Его выход составил 25.6% в расчете на линейное производное (XI) или 7.9% в расчете на стартовую аминокислоту.

Спонтанное замыкание дисульфидных связей в синтезе ET-3 проводили действием H₂O₂ в 8 М мочеvine, исходя из *тетра*-SH-производного (соединение (XIV) на рис. 1в). В этом случае реакция про-

текала неоднозначно: наряду с целевым, образовывались побочные продукты (рис. 4б). Для подбора оптимальных условий циклизации варьировали избыток перекиси водорода от 3 до 20 экв., время проведения реакции от 15 мин до 16 ч, концентрацию пептида от 0.2 мг/мл до 1 мг/мл и pH реакционной смеси от 8.0 до 9.5. Было показано, что на результаты окисления влияет только pH. Максимальное содержание целевого ET-3 в реакционной массе окисления (45%) и, соответственно, выход 19.7% (в расчете на соединение (XII)) были получены при pH 9–9.5. Эти наблюдения хорошо согласуются с данными работы [18] о преимущественном образовании изомеров природной структуры при высоких значениях pH в процессе спонтанной циклизации политиолсодержащих пептидов. Полученные побочные продукты (XV) и (XVI) (рис. 4б) были выделены методом препаративной ВЭЖХ и охарактеризованы данными аминокислотного анализа и ESI-MS, согласно которым были идентифицированы как структурные (дисульфидные) изомеры ET-3. Их выходы составили 5.1% для соединения (XV) и 10% для (XVI) в расчете на соединение (XII).

Таким образом, проведенные нами исследования показали принципиальную возможность замыкания дисульфидных связей действием перекиси водорода в метионинсодержащих пептидах без образования соответствующего сульфоксида в заметных количествах. Оба варианта замыкания дисульфидных связей (спонтанный и направленный) дали сравнимые результаты по выходам целевых продуктов. Однако каждая схема имеет свои преимущества и ограничения. Направленный способ синтеза позволяет получить соединения с заданным положением дисульфидных мостиков, но из-за многостадийности процесса выходы конечного продукта невелики. Хотя при спонтанной циклизации количество стадий меньше, наряду с целевым продуктом, образуются дисульфидные изомеры и выходы также невысокие. Следует отметить, что использование перекиси водорода при спонтанной циклизации приводит, как и в случае применения кислорода воздуха [2], к преимущественному образованию изомера с природным положением S–S-мостиков: соотношение ET-1/изомеры составляет 10/1/0 для H₂O₂ и 3/1/0 для O₂ [2]. При синтезе ET-3 это соотношение составляет 4/1/2. Можно сказать, что для ET-1 спонтанная циклизация с помощью перекиси водорода является в большей степени региоселективной, чем для ET-3. Кроме того, в случае H₂O₂, окисление проходит гораздо быстрее (не более 40 мин), чем при использовании кислорода воздуха (несколько часов) [2].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы производные *L*-аминокислот (Bachem, Швейцария), фенол (Merck, Германия), ацетат ртути, анизол, *p*-крезол, тиофенол, EDT, DTNB, DIC, HOBT (Fluka, Швейцария), 50% перекись водорода (Solvay Interco, Бельгия). Перед проведением реакций окисления перекись водорода разбавляли деионизированной водой до нужной концентрации и титровали 1 н. раствором KMnO_4 . Для синтеза применяли *N*-метилпирролидон, дихлорметан, пиперидин, метанол и трифторуксусную кислоту (Applied Biosystems GmbH, Германия). Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе (Gilson, Франция), для контроля спонтанной циклизации использовали колонку Ultrasphere ODS, 5 мкм (4.6×250 мм) (Beckman, США), во всех остальных случаях – Vydac C18, 5 мкм (4.6×250 мм) (Sigma, США), в качестве элюентов использовали буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А, элюция градиентом концентрации от 20 до 80% буфера Б в буфере А за 30 мин – градиент (1) или от 30 до 70% за 40 мин – градиент (2). Скорость потока 1 мл/мин, детекция при 226 нм. Препаративную ВЭЖХ проводили на приборе Beckman (США), колонке Диасорб С16 (25×250 мм), 10 мкм при длине волны 226 нм. В качестве элюентов использовали: А – 0.1% TFA, Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил (Technopharm, РФ). Для аминокислотного анализа пептиды гидролизovali 6 н. HCl, содержащей 2% тиогликолевой кислоты, 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 электроспреемным (API) ионным источником (Finnigan MAT). ^1H -ЯМР-спектры снимали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц (ФРГ) в $\text{DMSO-}d_6$ при 300 К, концентрация пептидов составляла 2–3 мг/мл. Химические сдвиги измерялись относительно тетраметилсилана. УФ-спектры получали на спектрофотометре Beckman DU-8B (США). В работе использовали HF в баллонах (Fluka, Швейцария), азот (в баллонах) марки “ос. ч.” (Россия).

Твердофазный синтез пептидов. Синтез пептидов проводили на автоматическом пептидном синтезаторе Applied Biosystems, модель 431A. В случае Вос-схем исходили из 0.1 ммоль (0.14 г) Вос-Trp(For)-полимера фирмы Applied Biosystems с содержанием стартовой аминокислоты 0.70 ммоль/г. Вос-производные аминокислот присоединяли по стандартной программе для однократной конденсации. Синтетический цикл включал 20-минутную активацию присоединяемой аминокислоты (1 ммоль) в присутствии эквива-

лентных количеств DIC и HOBT в NMP, деблокирование α -аминогрупп 50% раствором TFA в DCM в течение 20 мин, нейтрализацию 5% раствором диизопропилэтиламина в NMP в течение 7.5 мин, конденсацию 10-кратным избытком ацилирующего агента в NMP в течение 70 мин и все необходимые промежуточные промывки пептидилполимера. По окончании синтеза пептидилполимеры промывали DCM и сушили в вакууме. Полученные 0.47 г пептидилполимера (в случае ET-1) или 0.48 г (в случае ET-3) суспендировали в 3.4 мл смеси DMF–тиофенол (0.88 : 0.12), перемешивали при 20°C 4 ч, отфильтровывали, промывали на фильтре DMF (3×10 мл), водой (1×5 мл), MeOH (3×10 мл), DCM (3×10 мл), сушили в вакууме. Пептидилполимеры суспендировали в 5 мл смеси TFA–DCM (1 : 1), перемешивали 1 ч при 20°C, отфильтровывали, промывали на фильтре DCM (2×10 мл), MeOH (2×10 мл), DCM (5×10 мл), сушили в вакууме над пятиокисью фосфора. Пептидилполимеры обрабатывали 5 мл HF в присутствии 1 г *p*-крезола при –2°C в течение 1 ч. HF упаривали при 5°C, к остатку добавляли 100 мл сухого эфира, отфильтровывали, промывали сухим эфиром (5×10 мл). Пептиды экстрагировали 20 мл TFA, высаживали 100 мл сухого эфира, отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром (5×10 мл) и этилацетатом (3×5 мл), сушили в вакууме над NaOH. Получено 0.20 г сырого продукта линейного производного ET-1 с 31% содержанием основного вещества и 0.27 г производного ET-3 с 29% содержанием основного вещества по результатам аналитической ВЭЖХ.

При использовании Fmoc-схемы твердофазный синтез линейных предшественников ET-1 и ET-3 проводили, каждый раз исходя из 0.25 ммоль (0.33 г) Fmoc-Trp-полимера фирмы Bachem (Швейцария) с содержанием стартовой аминокислоты 0.76 ммоль/г. Аминокислотную цепь наращивали по стандартным программам для однократной конденсации Fmoc-аминокислот. Синтетический цикл включал 20-минутную активацию присоединяемой аминокислоты (1 ммоль) в присутствии эквивалентных количеств DIC и HOBT в NMP, деблокирование α -аминогрупп 20% раствором пиперидина в NMP в течение 20 мин, конденсацию с 1 ммолем (4-кратным избытком) ацилирующего агента в NMP в течение 70 мин и все необходимые промежуточные промывки пептидилполимера. По окончании твердофазного синтеза N^α -деблокированные пептидилполимеры суспендировали в 10 мл смеси 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.

H-Cys(Acm)-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys(Acm)-His-Leu-Asp-Ile-Pe-Trp(For)-OH (III). Циклизацию сырого продукта (соединение (I)) проводили порциями по 100 мг. Вещество растворяли при перемешивании в 100 мл 8 М раствора мочевины, добавляли 25% раствор аммиака до pH 8.0 и 0.04 мл (0.01 ммоль) 1% раствора H₂O₂. Образование S-S-связи контролировали при помощи ВЭЖХ (градиент 1) и реактива Элмана. По окончании реакции (через 10–15 мин) реакционную смесь барботировали азотом (20–30 мин). Отсутствие перекиси водорода определяли йод-крахмальной пробой. В реакционную смесь добавляли 2 мл AcOH и хроматографировали на колонке Vydac (16 × 250 мм). Элюцию проводили градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 0 до 20% за 10 мин и от 20 до 60% за 80 мин, скорость потока 5 мл/мин. Фракции, соответствующие целевому продукту, объединяли, ацетонитрил упаривали, остаток растворяли в воде и лиофилизировали. Получено 44.5 мг соединения (III) (17% в расчете на стартовую аминокислоту); R_t 18.54 мин, градиент (1). ESI-MS 2663.3 (вычислено 2663.9).

H-Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-OH (ET-1). К 44.5 мг (0.0167 ммоль) соединения (III) в 44 мл смеси MeOH-вода (8 : 1) добавляли 0.09 мл 5 н. HCl и 0.06 г (0.25 ммоль) йода в 2 мл MeOH. Через 40 мин добавляли 5% раствор аскорбиновой кислоты в цитратном буфере (pH 5) до обесцвечивания раствора, упаривали при 35°C до 10 мл, добавляли 30 мл воды и обессоливали методом препаративной ВЭЖХ на колонке Vydac в тех же условиях, что и при получении соединения (III). Фракции, соответствующие основному веществу, объединяли и лиофилизировали. Для удаления N¹⁰-For 22.0 мг лиофилизата растворяли в 3 мл 0.1 н. NaOH при 0°C, через 2 мин подкисляли 1 н. HCl и обессоливали на колонке Vydac в тех же условиях, описанных для соединения (III). Выход 16.0 мг (39% в расчете на соединение (III) или 7% в расчете на стартовую аминокислоту). R_t 19.03 мин, градиент (1). ESI-MS 2491.0 (вычислено 2491.9). Аминокислотный анализ: Asx 2.02 (2), Ser 1.96 (3), Glx 1.10 (1), Val 1.05 (1), Met 1.03 (1), Ile 1.60 (2), Leu 2.06 (2), Tyr 0.99 (1), Phe 0.97 (1), His 1.00 (1), Trp 0.48 (1), Lys 1.00 (1).

H-Cys(Acm)-Thr-Cys-Phe-Thr-Tyr-Lys-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Tyr-Cys(Acm)-His-Leu-Asp-Ile-Pe-Trp(For)-OH (IV). Циклизацию сырого соединения (II) проводили порциями по 90.0 мг. Вещество растворяли при перемешивании в 90 мл 8 М раствора мочевины, добавляли водный раствор аммиака до pH 7.0–8.0 и 0.08 мл (0.02 ммоль) 1% раствора H₂O₂. Образование S-S-связи контролировали при помощи ВЭЖХ (градиент (2)) и реактива Элмана. По окончании реакции (через 15 мин) к реакционной смеси добавляли 2 мл AcOH, хроматографировали в условиях, описанных для соединения (III). Получено 25.5 мг соединения (IV) (9% в расчете на стартовую аминокислоту). R_t 13.96 мин, градиент (2). ESI-MS 2815.9 (вычислено 2815.3).

H-Cys-Thr-Cys-Phe-Thr-Tyr-Lys-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Tyr-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-OH (ET-3) получали так же, как (ET-1), исходя из 25.5 мг (0.01 ммоль) соединения (IV). Выход 9.5 мг (40% в расчете на (IV) и 4% в расчете на стартовую аминокислоту). R_t 17.48 мин, градиент (2). ESI-MS 2642.1 (вычислено 2643.1). Аминокислотный анализ: Asp 1.72 (2), Thr 1.26 (2), Glu 1.01 (1), Val 0.91 (1), Ile 1.42 (2), Leu 0.92 (1), Tyr 2.71 (3), Phe 0.86 (1), His 1.00 (1), Trp 0.40 (1), Lys 1.73 (2).

H-Cys(Acm)-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys(Acm)-His-Leu-Asp-Ile-Pe-Trp-OH (IX). Циклизацию 443 мг сырого продукта твердофазного синтеза (VII) проводили порциями по 100 мг в соответствии с методикой, приведенной для получения соединения (III). Получено 37 мг соединения (IX) (6% в расчете на стартовую аминокислоту). R_t 18.53 мин, градиент (1). ESI-MS 2636.2 (вычислено 2636.0). Аминокислотный анализ: Asx 2.05 (2), Ser 2.5 (3), Glx 1.11 (1), Val 1.00 (1), Met 0.91 (1), Ile 1.62 (2), Leu 1.89 (2), Tyr 0.93 (1), Phe 1.13 (1), His 1.11 (1), Trp 0.31 (1), Lys 1.00 (1).

H-Cys(Acm)-Thr-Cys-Phe-Thr-Tyr-Lys-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Tyr-Cys(Acm)-His-Leu-Asp-Ile-Pe-Trp-OH (X). Циклизацию 518 мг сырого продукта твердофазного синтеза (VIII) проводили порциями по 100 мг в соответствии с методикой, приведенной для получения соединения (IV). Получено 150 мг соединения (X) (21% в расчете на стартовую аминокислоту). R_t 16.82 мин, градиент (1). ESI-MS 2787.9 (вычислено 2787.3). Аминокислотный анализ: Asx 1.98 (2), Thr 1.55 (2), Glx 1.2 (1), Val 0.91 (1), Ile 1.71 (2), Leu 1.11 (1), Tyr 2.84 (3), Phe 0.98 (1), His 1.04 (1), Trp 0.48 (1), Lys 2.00 (2).

H-Cys(Acm)-Ser-Cys(Acm)-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys(Acm)-Val-Tyr-Phe-Cys(Acm)-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-OH (XI). 480 мг сырого продукта твердофазного синтеза порциями по 50–70 мг растворяли в смеси 8 М мочевины/30% уксусная кислота-*n*-бутанол (4.5/4.5/1.0) и хроматографировали на колонке Диасорб С16 (25 × 250 мм). Элюцию проводили градиентом 0.5% в мин буфера Б в буфере А, начиная с 20% Б, со скоростью потока 12 мл/мин. Фракции, соответствующие целевому продукту, объединяли, упаривали, остаток растворяли в воде и лиофилизировали. Получено 220 мг соединения (XI) (32% в расчете на стартовую аминокислоту). R_t 18.9, градиент (1). ESI-MS 2779.9 (вычислено 2780).

H-Cys(Acm)-Thr-Cys(Acm)-Phe-Thr-Tyr-Lys-Asp-Lys-Glu-Cys(Acm)-Val-Tyr-Tyr-Cys(Acm)-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-OH (XII). Сырой продукт твердофазного синтеза (500 мг) очищали в условиях, приведенных для соединения (XI). Получено 238 мг соединения (XII) (32% в расчете на стартовую аминокислоту). R_f 17.4, градиент (1). ESI-MS 2931.7 (вычислено 2931).

H-Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-OH (ET-1) (спонтанная циклизация). К раствору 20 мг (0.0072 ммоль) соединения (XI) в 3 мл 50% AcOH в 8 М мочеvine прибавляли 18.2 мг (0.0570 ммоль) Hg(OAc)₂, перемешивали 1.5 ч при 25°C и пропускали ток сероводорода в течение 15–20 мин. Осадок сульфида ртути отфильтровывали. Фильтрат разбавляли 20 мл 8 М раствора мочевины, барботировали гелием, доводили pH до 8.5 25% раствором аммиака, прибавляли 0.05 мл (0.0144 ммоль) 1% раствора перекиси водорода и перемешивали 30–40 мин. Замыкание дисульфидных связей контролировали с помощью аналитической ВЭЖХ и реактива Эллана. Реакционную смесь барботировали гелием 20 мин, проверяли отсутствие H₂O₂, подкисляли до pH 4–5. Целевой продукт выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ в условиях, описанных для соединения (XI). Получено 4.6 мг ET-1 (26%). R_f 18.1 мин, градиент (1), 19.1 мин, градиент (2). ESI-MS 2491.2 (вычислено 2492). Аминокислотный анализ: Asx 2.00 (2), Ser 2.42 (3), Glx 1.12 (1), Val 0.99 (1), Met 0.92 (1), Ile 1.83 (2), Leu 1.90 (2), Tyr 0.98 (1), Phe 1.10 (1), His 1.03 (1), Trp 0.52 (1), Lys 1.00 (1).

H-Cys-Thr-Cys-Phe-Thr-Tyr-Lys-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Tyr-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-OH (ET-3) (спонтанная циклизация). Замыкание дисульфидных связей проводили в соответствии с вышеприведенной методикой спонтанной циклизации, исходя из 60 мг (0.02 ммоль) соединения (XII), с использованием 0.5 мл (0.10 ммоль) 1% перекиси водорода. Целевой и побочные продукты разделяли с помощью ВЭЖХ. Получено 10.4 мг ET-3 (19.7%). R_f 15.8 мин, градиент (1). ESI-MS 2642.7 (вычислено 2643.0). Аминокислотный анализ: Asx 2.00 (2), Thr 1.45 (2), Glx 0.99 (1), Val 1.05 (1), Ile 1.80 (2), Leu 1.00 (1), Tyr 2.74 (3), Phe 0.85 (1), His 1.06 (1), Trp 0.61 (1), Lys 2.07 (2). Побочный продукт (XV): 2.7 мг (5.1%). R_f 16.9 мин; ESI-MS 2642.5. Аминокислотный анализ: Asx 2.00 (2), Thr 1.50 (2), Glx 0.90 (1), Val 0.98 (1), Ile 1.75 (2), Leu 0.96 (1), Tyr 2.78 (3), Phe 0.86 (1), His 1.10 (1), Trp 0.67 (1), Lys 1.88 (2). Побочный продукт (XVI): 5.3 мг (10.0%). R_f 18.1 мин; ESI-MS 2642.5. Аминокислотный анализ: Asx 2.00 (2), Thr 1.50 (2), Glx 0.98 (1), Val 1.17 (1), Ile 1.96 (2), Leu 1.10 (1), Tyr 2.87 (3), Phe 0.83 (1), His 1.10 (1), Trp 0.62 (1); Lys 1.82 (2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barany G., Merrifield R.B. // The Peptides. V. 2 / Eds E. Gross, J. Meienhofer. N.Y.; L.: Acad. Press, 1980. P. 3–284.
2. Kumagaye S.-I., Kuroda H., Nakajima K., Watanabe T.X., Kimura T., Masaki H., Sakakibara S. // Int. J. Peptide Protein Res. 1988. V. 32. P. 519–526.
3. Moroder L., Besse D., Musiol H.-J., Rudolph-Bohner S., Siedler F. // Biopolymers. 1996. V. 40. P. 207–234.
4. Сидорова М.В., Кудрявцева Е.В., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // Биооргани. химия. 1995. Т. 21. С. 675–683.
5. Сидорова М.В., Кудрявцева Е.В., Антопольский М.Л., Палькеева М.Е., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // Биооргани. химия. 1996. Т. 22. С. 273–279.
6. Кудрявцева Е.В., Сидорова М.В., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н., Евстигнеева Р.П. // Биооргани. химия. 1996. Т. 22. С. 370–375.
7. Kudryavtseva E.V., Sidorova M.V., Ovchinnikov M.V., Bepalova Zh.D., Bushuev V.N. // J. Peptide Res. 1997. V. 49. P. 52–58.
8. Yanagisawa M., Inoue A., Ishikawa T., Kasuya Y., Kimura S., Kumagaye S., Nakajima K., Watanabe T., Sakakibara S., Goto K., Masaki T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 6964–6967.
9. Live H.D., Agosta C.W., Cowburn D. // J. Org. Chem. 1977. V. 42. P. 3556–3561.
10. Stewart J.M., Young J.D. // Solid Phase Peptide Synthesis / Second Edition. Rockford, IL.: Pierce Chemical Co., 1984.
11. Hong A.L., Culwell A.R. // User Bulletin Peptide Synthesizer. Applied Biosystems. 1987. № 11.
12. Andrey D., Albericio F., Sole N.A., Munson M.C., Ferrer M., Barany G. // Peptide Synthesis Protocols / Eds M.W. Pennington, M.B. Dunn. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1994. P. 91–169.
13. Eichler J., Houghen R.A. // Protein Peptide Lett. 1997. V. 4. P. 157–164.
14. Fields G.B., Noble R.L. // Int. J. Peptide Proteine Res. 1990. V. 35. P. 161–214.
15. King D.S., Fields C.G., Fields G.B. // Int. J. Peptide Proteine Res. 1990. V. 36. P. 255–266.
16. Wachter E., Werhahn R. // Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis. Proc. 3-rd Int. Conf. / Ed. Ch. Birr. Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980. P. 21–33.
17. Savige W.E., Fontana A. // Methods Enzymol. 1977. V. 47. P. 459–469.
18. Munson M.C. Synthesis of Disulfide-containing Peptides: New Strategies and Tactics. A thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Minnesota. USA: University of Minnesota, 1993. P. 91.

**Directed and Spontaneous Disulfide Bond Closure
by Hydrogen Peroxide during the Synthesis of Endothelin 1 and Endothelin 3**
E. V. Kudryavtseva[#], M. V. Sidorova, A. S. Molokoevov, M. V. Ovchinnikov, and Zh. D. Bespalova

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

The linear precursors of endothelin 1 and endothelin 3, natural vasoactive peptides, were obtained by using the Boc- and Fmoc-schemes of solid phase peptide synthesis. The methods of directed and spontaneous formation of two disulfide bonds in the molecules of these precursors were compared and shown to give comparable results. The conditions were found that provided the selective S-S-ring closure in the methionine-containing endothelin 1 by means of hydrogen peroxide without the undesired conversion of the Met residue into the corresponding sulfoxide.

Key words: endothelin 1, endothelin 3, solid phase peptide synthesis, directed and spontaneous oxidative closure of disulfide bonds, hydrogen peroxide

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 414-6716; fax: +7 (095) 414-6786;
e-mail: sag@mail.infotel.ru.