



УДК 547.96:542.95

## ПРЯМОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ S-АЦЕТАМИДОМЕТИЛЗАЩИЩЕННОГО ПЕПТИДА 593–603 gp-41 ВИЧ-2 В ЦИКЛИЧЕСКИЙ ДИСУЛЬФИД ПРИ ПОМОЩИ ИОДА. ИЗУЧЕНИЕ ПОБОЧНЫХ РЕАКЦИЙ

© 1996 г. Е. В. Кудрявцева<sup>#</sup>, М. В. Сидорова, М. В. Овчинников, Ж. Д. Беспалова, В. Н. Бушуев, Р. П. Евстигнеева\*

Кардиологический научный центр РАМН, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15-а

\* Московская академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 14.11.95 г.

Изучена стадия удаления Асм-защитной группы тиольной функции цистеина с одновременным замыканием дисульфидной связи при помощи иода в уксусной кислоте на примере синтеза пептидного фрагмента гликопротеина gp-41 ВИЧ-2, соответствующего последовательности 593–603. Изучено влияние на циклизацию избытка иода. Выделены и идентифицированы побочные продукты создания S-S-связи с использованием аминокислотного и элементного анализов, масс-спектрометрии, ЯМР- и УФ-спектроскопии.

*Ключевые слова:* ацетамидометил, иод, дисульфидная связь, побочные реакции, триптофан-2-тиоэфир.

Биологическая активность пептидов часто непосредственно связана с наличием внутримолекулярных дисульфидных связей. Успех синтеза таких пептидов во многом зависит от эффективности выбранного метода образования дисульфидных мостиков. В настоящее время существует ряд способов их создания, но ни один из них не является универсальным. Циклизация зачастую протекает неоднозначно. Кроме внутримолекулярных образуются межмолекулярные дисульфидные связи, в реакцию окисления вступают не только SH-группы, но и функциональные группы боковых цепей триптофана и тирозина [1]. В литературе часто констатируют факт получения побочных продуктов, однако информации об их структуре недостаточно.

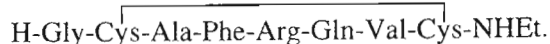
Настоящая работа – продолжение исследований по оптимизации синтеза ундекапептида последовательности 593–603 трансмембранного гликопротеина gp-41 ВИЧ-2 [2] – посвящена выделению и идентификации примесей, образующихся при прямом окислении иодом в уксусной кислоте Асм-защитного пептида в циклический дисульфид (рис. 1).

Ранее нами было установлено, что использование такого метода циклизации приводит к образо-

ванию целевого и побочного продуктов в соизмеримых количествах [2]. В связи с этим нам представлялось интересным изучить влияние условий проведения циклизации (избытков иода и используемого растворителя) на количество и соотношение побочных продуктов и изучить их структуру.

При действии 13 экв. иода реакционная смесь состояла из целевого пептида (II) и побочных продуктов (III) и (IV) (табл. 1 и рис. 2а). Они были выделены с помощью препаративной ВЭЖХ и проанализированы различными методами (табл. 2 и 3).

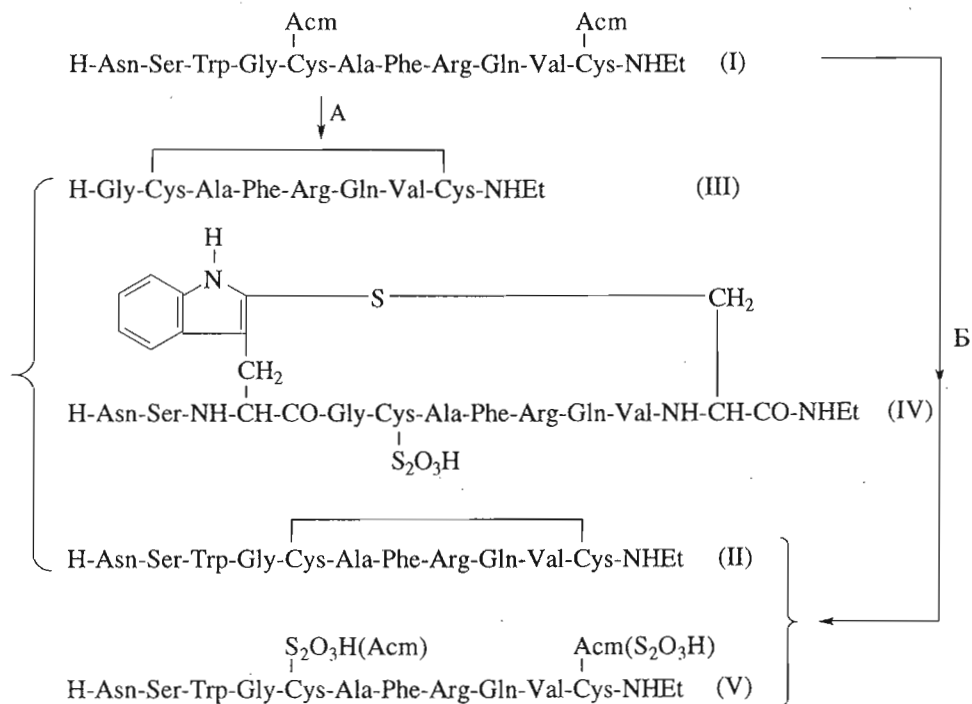
Соединение, соответствующее пику (III) на рис. 2а, представляет собой продукт окислительно-галогенирования остатка триптофана, приводящего к разрыву пептидной цепи [2]. Аминокислотный состав и молекулярная масса этого соединения соответствовали циклическому октапептиду (III) [2]:



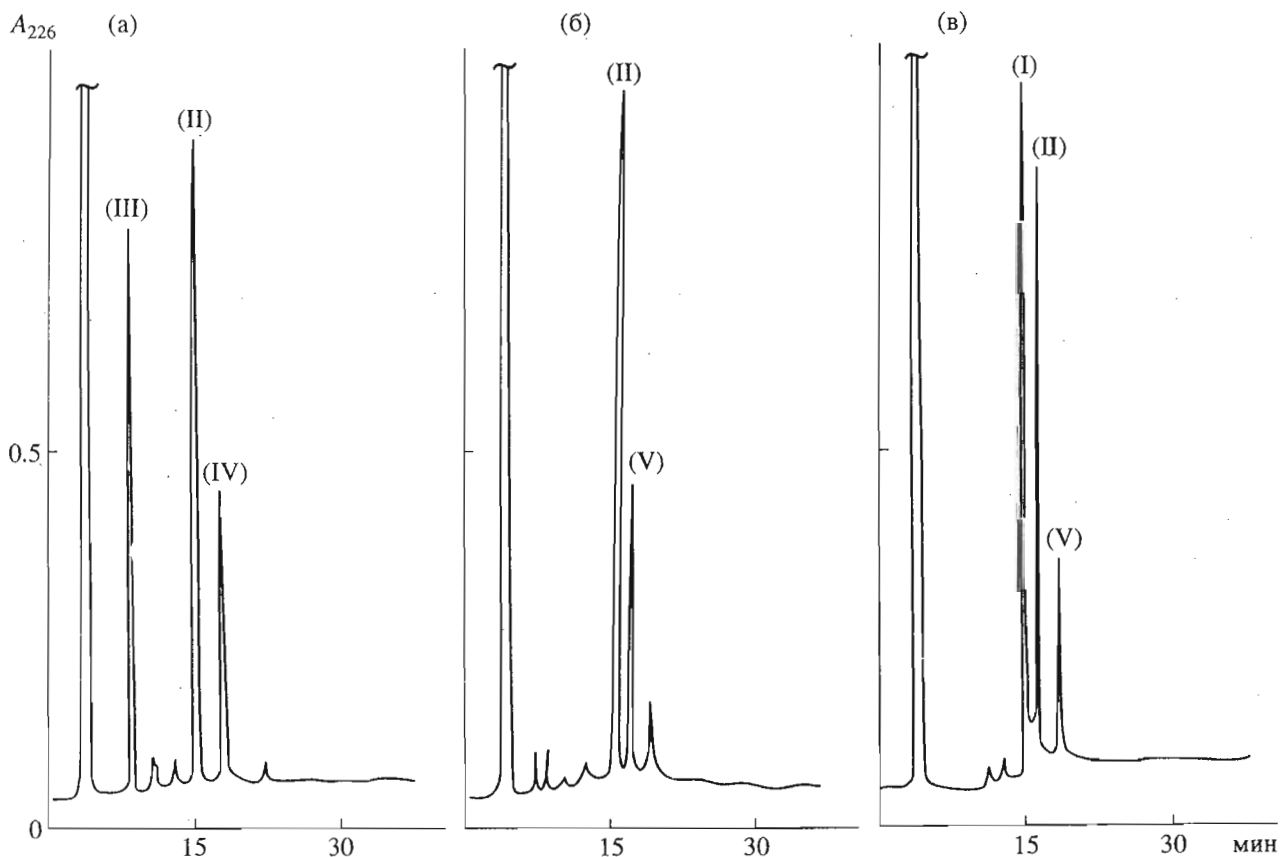
Другой побочный продукт (IV) (рис. 2а) был получен только в случае удаления избытка иода тиосульфатом натрия. При замене последнего на аскорбиновую кислоту, а также в опытах с меньшими избытками иода образования примеси (IV) не наблюдалось. В работе [2] на основании данных масс-спектрометрии, аминокислотного и элементного анализов мы предположили, что в соединении (IV) один из остатков цистеина модифицирован тиосульфат-анионом. В настоящей работе мы предприняли дополнительные исследования этого соединения методами УФ- и ЯМР-спектроскопии.

Использованы сокращения, рекомендованные комиссией IUPAC-IUB (Eur.J. Biochem. 1984. V. 183. P. 9–37), а также: Асм – ацетамидометил, АсОН – уксусная кислота, ESI-MS (electrospray ionisation mass spectrometry) – масс-спектрометрия с электроспрей-ионизацией, ВИЧ – вирус иммунодефицита человека.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



**Рис. 1.** Схема превращений Cys(AcM)-ундекапептида последовательности 593–603 gp-41 ВИЧ-2 (пептид I) под действием иода в уксусной кислоте при избытке иода 13 (A) и 5 моль/моль (I) (Б). (II) – целевой циклический продукт; (III), (IV), (V) – побочные продукты.



**Рис. 2.** Аналитическая ВЭЖХ реакционных смесей окисления пептида (I) иодом в уксусной кислоте при избытке иода (моль/моль (I)): 13 (а), 5 (б), 2 (в). Элюция градиентом от 20 до 80% буфера Б в буфере А за 30 мин, скорость потока 1 мл/мин. Для обозначения пиков использовались шифры пептидов, указанные на рис. 1.

**Таблица 1.** Состав реакционной массы (% по данным ВЭЖХ) при окислении пептида (I) в зависимости от избытка иода

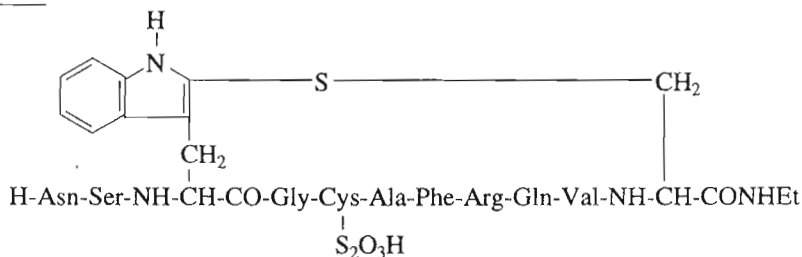
Количество иода, моль/моль (I)	Состав реакционной массы					Выход* пептида (II), %
	(II)	(I)	(III)	(IV)	(V)	
13	27.6	—	25.6	12.7	—	28.0
7	54.2	—	16.5	—	—	39.0
5	33.8	—	—	—	16.5	30.0
2	41.8	37.0	—	—	12.0	—

\* Приведены выходы в расчете на Асп-производное пептида (I).

Исследование УФ-спектра побочного продукта (IV) показало, что максимум поглощения, характерный для индольного кольца триптофана, смещен в длинноволновую область (рис. 3) ( $\lambda_{\max}$  299 нм по сравнению с  $\lambda_{\max}$  280 нм для продукта (II)), а молярный коэффициент поглощения увеличен почти вдвое (табл. 2), что позволяет предполагать модификацию индольного кольца в триптофане [1].

Сравнительный анализ спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР (II) и (IV) показал, что в спектре побочного продукта (IV) отсутствует сигнал протона при атоме углерода во 2-м положении индольного кольца триптофа-

на, а также имеются значительные различия в химических сдвигах сигналов протонов триптофана (рис. 4а) и ближайших к нему по последовательности аминокислотных остатков. Так, химический сдвиг сигнала NH-индольного кольца триптофана изменяется от 10.8 до 11.2 м. д., а амидного протона серина — от 8.58 до 8.32 м. д. Таким образом, данные УФ- и ЯМР-спектроскопии свидетельствуют о том, что в побочном продукте (IV) произошла модификация индольного кольца триптофана в положении 2. Наиболее вероятной причиной представляется образование триптофан-2-тиоэфира. Из литературы известно, что триптофан-2-тиоэфиры получают при помощи сульфенилгалогенидов [3]. Так как удаление Асп-защитной группы происходит через образование высокоактивного сульфенил-иодида [4], то образование триптофан-2-тиоэфира в качестве побочного продукта в этом случае весьма вероятно. Образование триптофан-2-тиоэфиров наблюдалось ранее при синтезе соматостатина и модельных пептидов сходной структуры [3]. На модельных пептидах в работе [3] было показано, что триптофан-2-тиоэфиры образуются лишь в случае, если между триптофаном и цистеином находятся по меньшей мере 3–4 аминокислоты. На основании полученных результатов и литературных данных мы предположили следующую структуру соединения (IV):



Уменьшение избытка иода до 7 экв. позволило несколько повысить выход целевого продукта (II) (табл. 1) и понизить, а при использовании 5 экв. — избежать образования побочного продукта (III)

(рис. 2б). Но при этом в реакционной смеси появляется другой побочный продукт — (V), образование которого наблюдалось и в опыте с использованием 2 экв. иода (рис. 2в). Следует отметить

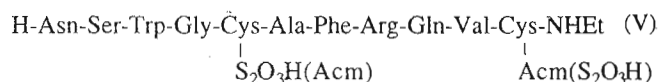
**Таблица 2.** Характеристики продуктов окисления пептида (I) иодом в АсОН

№	Структура соединения	$R_f$ , мин	MS $[M + \text{H}]^+$	$\lambda_{\max}$ , нм	$\epsilon \times 10^4, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
(II)	NSWGCAFRQVC-NHEt	15.48	1295.9	280	0.50
(III)	GCAFRQVC-NHEt	11.10	907.6	—	—
(IV)	NSWGCAFRQVC-NHEt $\quad \quad \quad  $ $\quad \quad \quad \text{S}_2\text{O}_3\text{H}$	16.70	1407.7	299	0.90
(V)	NSWGCAFRQVC-NHEt $\quad \quad \quad  $ $\quad \quad \quad (\text{Ac})\text{S}_2\text{O}_3\text{H}$ $\quad \quad \quad  $ $\quad \quad \quad \text{Ac}(\text{S}_2\text{O}_3\text{H})$	16.78	1481.0	280	0.46



также, что 2 экв. недостаточно для полного отщепления Acst-защит, так как в реакционной смеси присутствовало исходное соединение (I).

Аминокислотный состав побочного продукта (V) соответствует составу целевого продукта (II) (табл. 3), УФ-спектр идентичен спектру вещества (II), однако молекулярная масса на 186 Да больше, чем у пептида (II). В спектре <sup>1</sup>H-ЯМР вещества (V) содержатся сигналы протонов всех аминокислотных остатков, входящих в состав целевого продукта (II). Отличием является лишь присутствие спин-связанных сигналов при 8.51 (рис. 4б) и 4.23 м. д., а также синглетного сигнала при 1.84 м. д., которые могут быть отнесены соответственно к протонам NH, CH<sub>2</sub> и CH<sub>3</sub>-групп Acst-защиты. Интегральная интенсивность этих сигналов соответствует одному остатку Acst на молекулу, а сумма молекулярных масс остатков Acst-защиты и тиосульфат-аниона точно соответствует разнице молекулярных масс целевого (II) и побочного (V) продуктов. Поэтому мы предположили, что соединение (V) содержит Acst-защиту на одном из остатков цистеина (5 или 11), а другой остаток цистеина, вероятно, модифицирован тиосульфат-ионом. Дополнительным подтверждением наличия тиосульфат-аниона является элементный анализ соединения (V) на содержание серы, которое было вдвое выше содержания серы в целевом продукте (II):



Таким образом, замыкание S-S-мостика в исследуемом пептиде (I) под действием иода в уксусной кислоте протекает неоднозначно и в зависимости от избытка окислителя сопровождается такими побочными реакциями, как неполное отщепление Acst-защиты с присоединением к свободному остатку цистеина тиосульфат-иона (V), разрыв связи Trp-Gly (III), образование производного пептида, содержащего триптофан-2-тиоэфир и модифицированного по остатку Cys<sup>5</sup> тиосульфат-ионом (IV).

Поэтому в дальнейших опытах была опробована методика окисления иодом в водном метаноле при нейтральных pH [5]. В этом случае даже 2 экв. иода было достаточно для полного деблокирования SH-групп цистеина и реакция протекала без образования заметных количеств побочных продуктов. Но, варьируя условия проведения реакции, нам не удалось добиться выхода больше 66%. Таким образом, очевидно, что при проведении реакции окисления важно правильно выбрать подходящий растворитель. В нашем случае таким растворителем оказался водный метанол.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез соединения (I) был подробно описан в работе [2]. Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке (4.6 × 250 мм) Ultrasphere ODS (5 мкм; Beck-

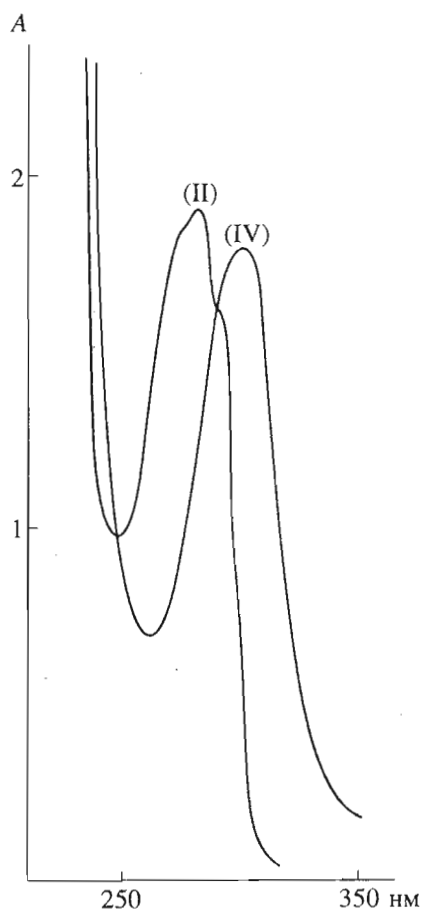


Рис. 3. УФ-спектры целевого продукта (II) (3.9 × 10<sup>-4</sup> М в воде) и побочного продукта (IV) (2.04 × 10<sup>-4</sup> М в воде).

man, США) на хроматографе Gilson (Франция), в качестве элюентов использовали буферы А (0.05 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, pH 3.0) и Б (70% ацетонитрила + 30% буфера А). Для препаративной ВЭЖХ использовали колонку (25 × 250 мм) диасорб С 16 (5 мкм) на приборе Beckman (США) при длине волны 226 нм.

Таблица 3. Аминокислотный анализ целевого пептида (II) и побочных продуктов (III)-(V)

Аминокислоты*	(II)	(III)	(IV)	(V)
Asx	1.02 (1)	-	1.00 (1)	0.93 (1)
Ser	0.91 (1)	-	0.60 (1)	0.53 (1)
Glx	1.08 (1)	0.95 (1)	1.05 (1)	0.95 (1)
Gly	1.00 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)
Ala	1.04 (1)	1.09 (1)	1.00 (1)	1.12 (1)
Val	0.99 (1)	0.96 (1)	1.40 (1)	0.98 (1)
Phe	0.97 (1)	0.95 (1)	1.01 (1)	0.95 (1)
Trp	0.78 (1)	-	0.46 (1)	0.72 (1)
Arg	1.08 (1)	0.89 (1)	0.80 (1)	0.88 (1)

\* Cys не определяли.

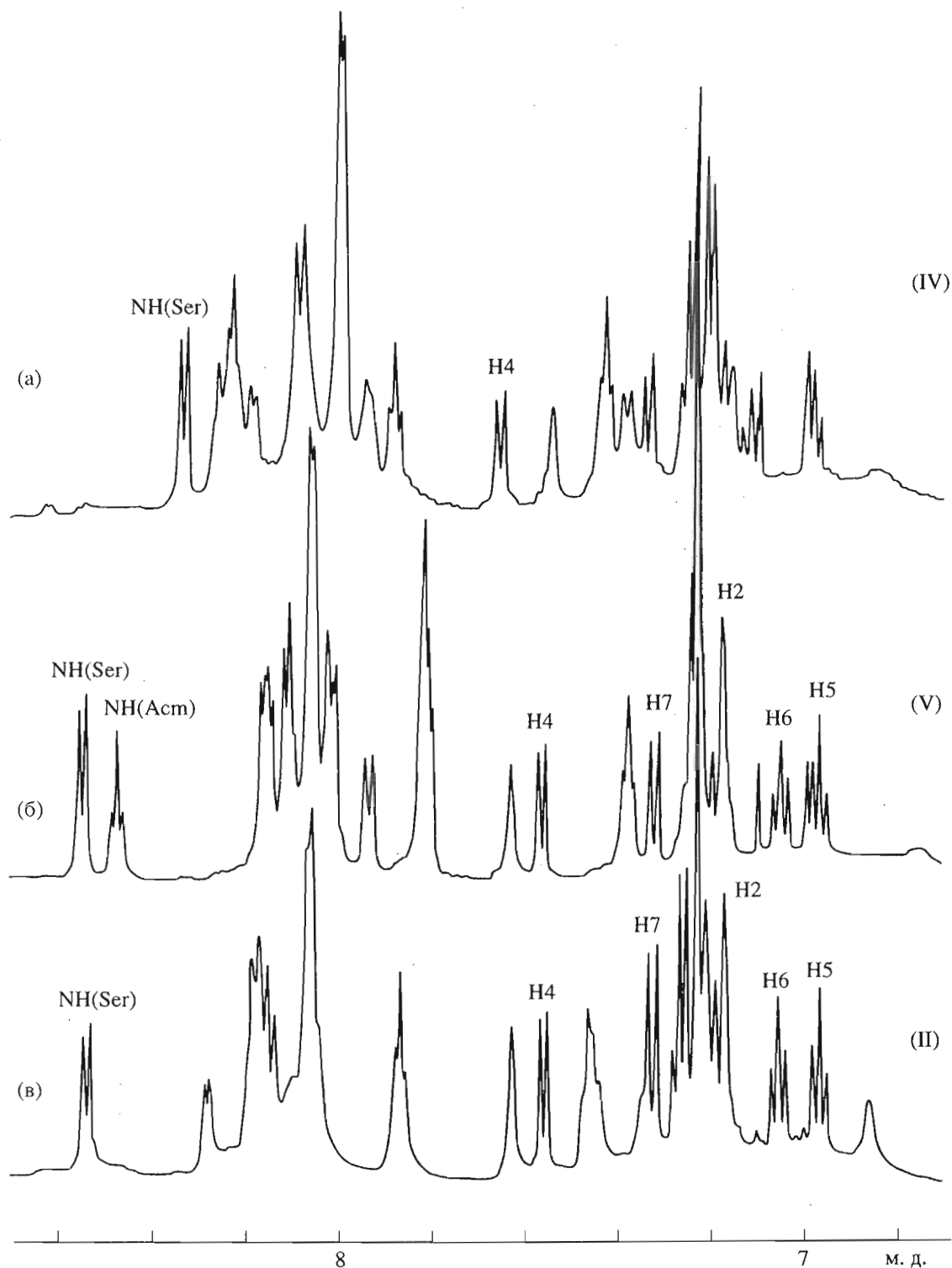


Рис. 4. Низкопольная часть спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР сигналов амидных протонов и ароматических протонов триптофана целевого вещества (II) (в) и побочных продуктов (IV) (а) и (V) (б).

Элюенты: А – 0.1% трифторуксусная кислота, Б – 80% ацетонитрила + 20% буфера А. Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил фирмы Technofarm (РФ). Аминокислотный состав определяли на автоматическом анализаторе Biotronik 5001 (Германия) по

сле гидролиза пептидов 6 н. HCl, содержащей 2% тиогликолевой кислоты (24 или 48 ч при 110°C). Масс-спектры снимали на квадрупольном масс-спектрометре Finnigan MAT TSO 700 (Германия) с электроспрейным (API) ионным источником (Finnigan

МАТ), ЯМР-спектры – на спектрометре WH-500 Bruker в DMSO- $d_6$  при 27°C. УФ-спектры получали на спектрофотометре Beckman DU-8B (США).

**Типовая методика получения циклического дисульфида (II) при помощи  $I_2$  в AcOH.** К раствору 0.20 г (0.14 ммоль) соединения (I) в 50% AcOH добавляли соответствующий избыток (см. табл. 1) иода, растворенного в 80% AcOH (2.25 мг/мл; конечная концентрация пептида 1 мг/мл), и перемешивали 2 ч. Избыток иода удаляли 10% раствором тиосульфата натрия до обесцвечивания, упаривали до объема 30 мл и хроматографировали на колонке с диасорбом-С16. Элюцию проводили градиентом от 20 до 60% буфера Б в буфере А за 40 мин со скоростью потока 12 мл/мин. Фракции, соответствующие целевому и побочным продуктам, упаривали, растворяли в воде и лиофилизировали. Выходы и характеристики целевого и побочных продуктов представлены в табл. 1–3.

**Типовая методика получения циклического дисульфида (II) при помощи  $I_2$  в метаноле.** Раствор 0.025 г (0.017 ммоль) соединения (I) (0.2 мг/мл) в

смеси метанол–вода (1 : 6) продували азотом, прибавляли по каплям при перемешивании раствор 0.018 ммоль иода в метаноле (1 мг/мл) в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C, обесцвечивали 1 М раствором тиосульфата натрия. Метанол упаривали, продукт выделяли как описано в предыдущем опыте. Выходы целевого продукта (II) составляли 64.0–66.0%.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barany G., Merrifield R.B. // *The Peptides*. V. 2 / Eds E. Gross, J. Meienhofer. N.Y.; L.: Acad. Press, 1980. P. 164–250.
2. Сидорова М.В., Кудрявцева Е.В., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 675–683.
3. Sieber P., Kamber B., Riniker B., Rittel W. // *Helv. Chim. Acta*. 1980. V. 63. P. 2358–2363.
4. *Защитные группы в органической химии* / Ред. Дж. Мак-Оми. М.: Мир, 1976.
5. Stewart J.M., Young J.D. *Solid Phase Peptide Synthesis*. 2Ed. N.Y.: Pierce Chem. Company, 1984.

## Direct Iodine Oxidation of S-Acetamidomethyl Protected Peptide Corresponding to the 593–603 Sequence of HIV-2 gp41 Protein to Cyclic Disulfide. Examination of Side Reactions

E. V. Kudryavtseva\*,<sup>1</sup> M. V. Sidorova\*, M. V. Ovchinnikov\*, Zh. D. Bespalova\*, V. N. Bushuev\*, and R. P. Evstigneeva\*\*

\* *Cardiological Scientific Center, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Tret'ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552, Russia*

\*\* *Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia*

**Abstract**—Removal of Acm-protecting group from thiol functional groups of Cys residues with simultaneous disulfide bridge formation by iodine in acetic acid was studied in the course of the synthesis of a peptide fragment corresponding to 593–603 sequence of HIV-2 gp41 glycoprotein. The excess iodine influence on the cyclization process was investigated. By-products of the oxidative disulfide formation were isolated, and their structures were elucidated by means of amino acid and elemental analyses, mass spectrometry, NMR, and UV-spectroscopy.

*Key words:* acetamidomethyl, iodine, disulfide bond, side reactions, 2-thioether of tryptophan.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.