



УДК 577.112.6:547.495.9:542.95

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АРГИНИН С НЕЗАЩИЩЕННОЙ ГУАНИДИНОВОЙ ГРУППОЙ

© 2000 г. А. Ю. Рубина[#], Ж. Д. Беспалова, В. Н. БушуевРоссийский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ России,
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

Поступила в редакцию 24.06.99 г. Принята к печати 07.10.99 г.

Предложен новый вариант твердофазного синтеза аргининсодержащих пептидов. Подобраны условия присоединения N^α -Fmoc-аргинина с протонированной гуанидиновой группой к полимерному носителю Ванга. Продемонстрировано отсутствие рацемизации и удвоения остатка аргинина. Изучены побочные реакции с участием гуанидиновой группы аргинина и предложен способ их предотвращения. Сравнительная оценка карбодиимидного метода с добавкой 1-гидроксибензотриазола и модифицированного метода с использованием реагента Кастро для введения N^α -Fmoc-аргинина без защиты гуанидиновой группы в наращиваемую пептидную цепь показала преимущество последнего. Предлагаемым способом синтезированы пептиды: брадикинин и фрагмент 584–591 трансмембранного белка gp41 ВИЧ-1.

Ключевые слова: аргинин, гуанидиновая группа; пептиды, твердофазный синтез; реагент Кастро; ¹H-ЯМР; брадикинин.

При твердофазном синтезе пептидов, содержащих один или несколько остатков аргинина в цепи, неизбежно возникают проблемы, связанные с защитой гуанидиновой группы (N^G) в связи с вероятностью ее ацилирования в процессе конденсации, и проблема снятия введенных N^G -защитных групп. Показано, что использование N^G -защитных групп уретанового типа (Woc, Adoc) для N^α -Fmoc-производных аргинина не предотвращает ацилирование гуанидиновой группы и образование орнитина [1, 2]. В то же время деблокирование пептида, содержащего несколько остатков аргинина, защищенных Mtr-группами, требует жестких условий и длительной обработки, что часто приводит к образованию побочных продуктов [3, 4].

Используя Mtr-защитную группу при синтезе фрагмента 584–618 трансмембранного белка gp41 ВИЧ-1 мы столкнулись именно с такой ситуацией [4]. После деблокирования и отщепления пептида от пептидполимера из реакционной смеси был выделен и охарактеризован побочный продукт, образующийся в результате взаимодействия индольного кольца остатка триптофана с TFA и 1,2-этан-

дитиолом. Предотвратить образование этого побочного продукта нам позволило использование N^G -Fmoc-защитной группы, требующей меньшего времени для деблокирования. Однако следует отметить, что Fmoc-производное аргинина – дорогостоящее соединение, получаемое путем многостадийного синтеза.

В литературе описано несколько случаев использования в твердофазном синтезе пептидов аргинина с гуанидиновой функцией, защищенной протонированием. Так, в работе [5] предложен синтез антагониста LH-RH, проводимый с использованием Woc-Arg · HCl. Авторами работы [6] сообщается об успешном использовании Fmoc-стратегии ТФС с защитой гуанидиновой группы аргинина протонированием для получения фрагмента 4–15 λ -сго-репрессора, но не приводятся никаких экспериментальных данных. В работе [7] описывается не совсем удачная попытка синтеза декапептида, содержащего один остаток аргинина, с использованием протонирования для его защиты, при этом в конечном продукте 25% составляла примесь пептида, не содержащего аргинин.

Учитывая все это и имея большой опыт синтеза в растворе аргининсодержащих пептидов с протонированной гуанидиновой группой [8, 9], мы решили выяснить возможность использования такого типа защиты аргинина в условиях Fmoc-стратегии ТФС. Перед нами стояло две задачи: посадка C-концевого Fmoc-производного протонированного аргинина на полимерный носитель и введение Fmoc-аргинина без дополнительной

Сокращения: EDT – 1,2-этандитиол; Mtr – 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил; Fmoc – 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; DIPCDI – *N,N'*-диизопропилкарбодиимид; HOBt – 1-гидроксибензотриазол; BOP – гексафторфосфат бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфония (реагент Кастро); P – полимер; ESI-MS – масс-спектрометрия с электроспрейным ионным источником; ТФС – твердофазный синтез.

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

Таблица 1. Присоединение Fmoc-Arg(H⁺)-ОН к смоле Ванга с содержанием гидроксиметильных групп 0.45 ммоль/г DIPCDI-методом*

Катализатор	Количество катализатора, моль/моль аминокислоты	Время реакции, ч	Степень замещения	
			ммоль/г	%
DMAP	0.2	1	0.056	12
		24	0.160	36
Имидазол	1	24	0.037	8
		2	0.040	9
Имидазол-NOBt	0.7	1	0.320	71
1-Метилимидазол	0.7	2	0.420	93
		24	0.410	91

* Избыток аминокислоты по отношению к гидроксиметильным группам полимера во всех случаях составлял 5 экв.

защиты гуанидиновой группы в наращиваемую полипептидную цепь.

В качестве носителя для ТФС мы выбрали полимер Ванга (сополимер стирола с 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой) [10] с содержанием гидроксиметильных групп 0.45 ммоль/г.

При присоединении Fmoc-аминокислот к полимерному носителю наиболее часто используют карбодиимид (DCC или DIPCDI) с добавкой 4-диметиламинопиридина (DMAP) для катализа процесса алкохолиза [11–13], поэтому первоначально мы применили именно этот метод. Все предпринятые нами попытки исчерпывающе присоединить Fmoc-Arg(H⁺)-ОН указанным выше методом не увенчались успехом, содержание аминокислоты на полимере составляло всего 0.05–0.16 ммоль/г (степень замещения 10–35%), в то время как присоединение Fmoc-Arg(Pmc)-ОН в тех же условиях и к тому же носителю происходило без осложнений и степень замещения составляла 82% (0.37 ммоль/г).

Известно, что при присоединении N^α-защищенных аминокислот к гидроксигруппам полимерного носителя в качестве катализатора используют также пиридин [14] и имидазол [15]. В работе [16] авторы исследовали кинетику и механизм реакции ацетилирования гидроксисоединений, катализируемой пиридином, имидазолом и 1-метилимидазолом. Было показано, что 1-метилимидазол – наиболее эффективный катализатор: скорость реакции с его участием превышает на два-три порядка скорости реакций с участием пиридина и имидазола.

Нами проведен ряд экспериментов по присоединению Fmoc-Arg(H⁺)-ОН к смоле Ванга карбодиимидным методом с использованием в качестве катализатора перечисленных выше соединений и также показано, что наилучшие результаты дает применение 1-метилимидазола (табл. 1). В результате были подобраны условия, при которых содержание стартовой аминокислоты на смоле достигало 0.42 ммоль/г (93%): Fmoc-Arg-ОН,

бромгидрат пиридина и DIPCDI в эквимольных количествах и в 5-кратном избытке по отношению к содержанию гидроксильных групп полимера, 1-метилимидазол в количестве 0.7 эквивалента по отношению к аминокислоте, время реакции 2 ч при комнатной температуре.

Полученный Fmoc-Arg(H⁺)-OP с содержанием аминокислоты 0.42 ммоль/г мы использовали для синтеза первого модельного объекта – брадикинина H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-ОН, синтез которого в классическом варианте хорошо отработан.

При посадке на полимер C-концевого Fmoc-аргинина, как и любой другой аминокислоты, возможно протекание таких побочных реакций, как рацемизация и образование дипептида (Arg-Arg), вызванных присутствием основания, например DMAP [12, 13, 17]. И хотя 1-метилимидазол, обладающий менее выраженными основными свойствами (pK_a 7.0) [14] по сравнению с DMAP (pK_a 9.7) [18], не должен в значительной степени способствовать протеканию этих реакций, нам необходимо было проверить это.

Для определения степени рацемизации остатка аргинина при посадке на смолу и выявления возможного образования дипептида мы синтезировали модельные пептиды: H-Phe-Arg-ОН, H-Phe-D-Arg-ОН и H-Phe-Arg-Arg-ОН, которые были охарактеризованы методами ¹H-ЯМР и ESI-MS.

При синтезе H-Phe-Arg-ОН полученный нами после отщепления от полимера действием 95% водной TFA сырой продукт, по данным аналитической ВЭЖХ, представлял собой смесь веществ, которая, однако, не содержала ни заметной примеси D-изомера, ни видимых количеств H-Phe-Arg-Arg-ОН (рис. 1а и б). Таким образом, нами было показано, что при посадке на смолу Fmoc-Arg(H⁺)-ОН описанным выше методом не происходит ни рацемизации остатка аргинина, ни его удвоения.

Поскольку содержание целевого соединения H-Phe-Arg-ОН составляло лишь 60%, мы разделили полученную смесь веществ методом препара-

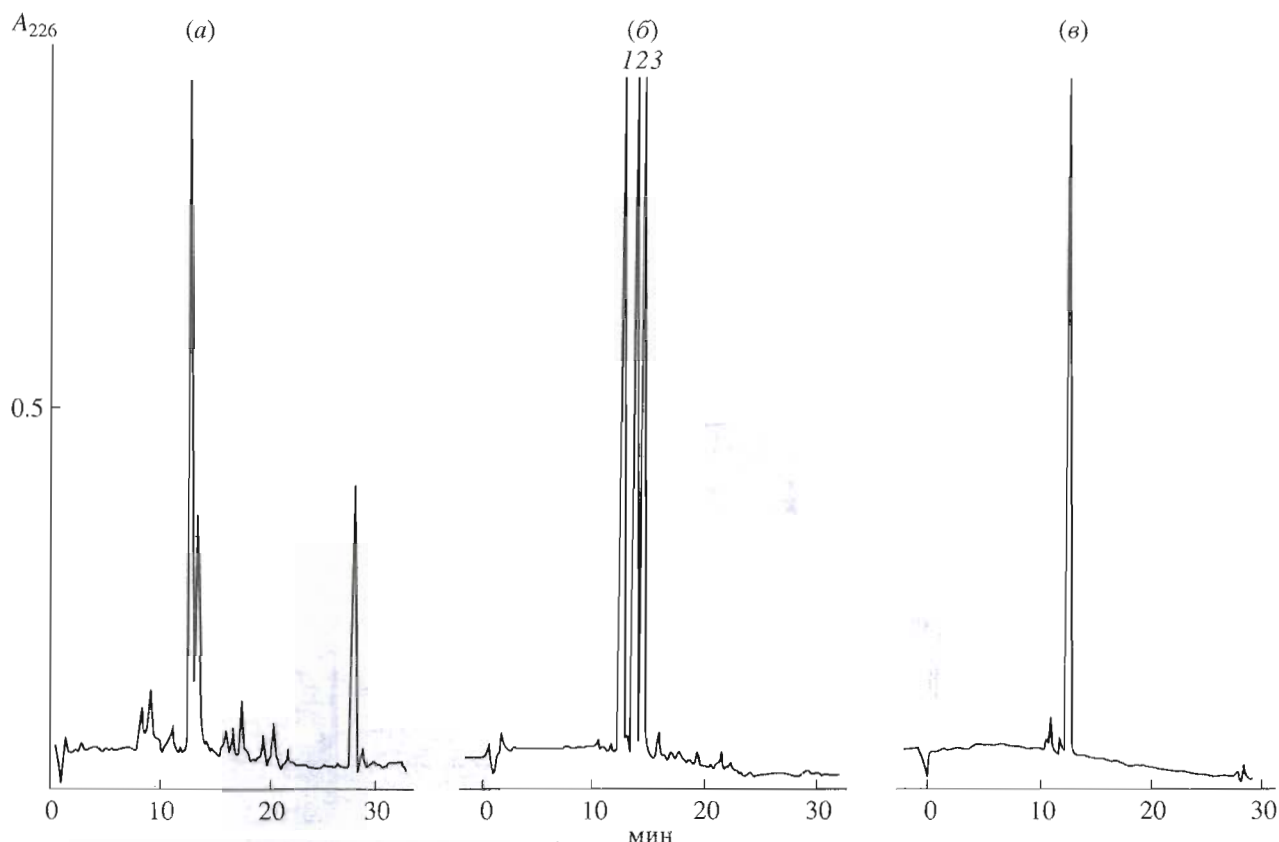
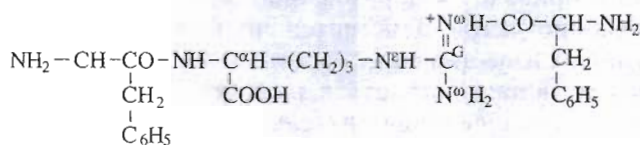


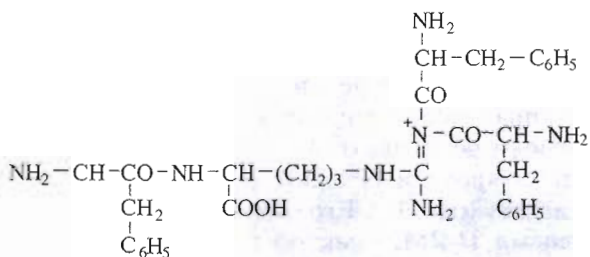
Рис. 1. Профили аналитической ВЭЖХ (колонка Nucleosil C-18, 5 мкм (4.6 × 150 мм), градиент 1, см. “Эксперимент. часть”): сырого продукта, H-Phe-Arg-OH (а); искусственной смеси трех соединений: H-Phe-Arg-OH (1) + H-Phe-D-Arg-OH (2) + H-Phe-Arg-Arg-OH (3) (б); сырого продукта H-Phe-Arg-OH, полученного в ходе синтеза с дополнительной стадией протонирования гуанидиновой группы (в).

тивной ВЭЖХ, в результате чего был получен ряд побочных продуктов. Анализ спектров ¹H-ЯМР выделенных соединений показал, что они представляют собой результат ацилирования гуанидиновой группы аргинина фенилаланином: H-Phe-Arg(Phe-)-OH и H-Phe-Arg(Phe-)₂-OH.

H-Phe-Arg(Phe-)-OH



H-Phe-Arg(Phe-)₂-OH



Отнесение сигналов в спектрах к конкретным группам протонов аминокислотных остатков и определение структуры исследуемых пептидов проведено методом двойного резонанса, ядерного эффекта Оверхаузера, а также исходя из сравнения химических сдвигов данных пептидов.

Подтверждением образования связи между одной из ω-аминогрупп гуанидиновой группы аргинина и карбоксильной группой фенилаланина является наличие в ¹H-ЯМР-спектре (рис. 2в) синглетного сигнала при 10.1 м. д. в слабом поле, а также дополнительных сигналов C^αH (4.71 м. д.), C^βH (3.09 м. д.) и протонов ароматического кольца фенилаланина (7.30 и 7.20 м. д.).

Следует отметить, что при 27°C в спектре наблюдается не один, а три синглетных сигнала N^ωH-группы в слабом поле (10.1, 10.01 и 9.65 м. д.), три сигнала C^αH аргинина (4.26, 4.21 и 4.14 м. д.), три триплетных сигнала от протонов N^εH-гуанидиновой группы аргинина (9.54, 9.43 и 8.73 м. д.) и по крайней мере два сигнала от C^αH присоединенного по гуанидиновой группе фенилаланина (4.71 и 4.64 м. д.). Присутствие в спектре трех наборов различных по интенсивности сигналов протонов

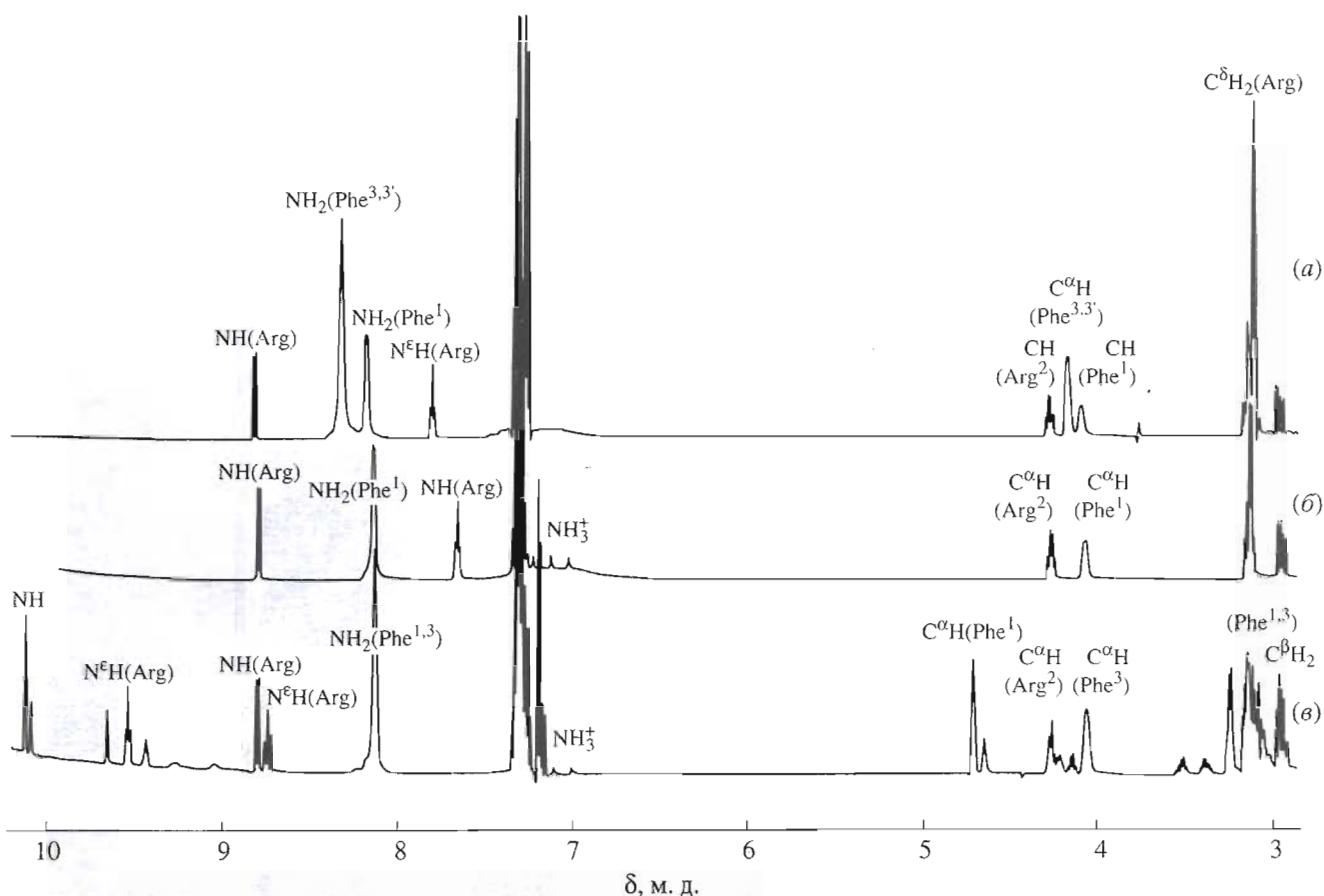


Рис. 2. Спектры ^1H -ЯМР в $\text{DMSO-}d_6$ в присутствии TFA при 27°C : $\text{H-Phe-Arg(Phe-)}_2\text{-OH}$ (а); H-Phe-Arg-OH (б); $\text{H-Phe-Arg(Phe-)-OH}$ (в).

свидетельствует о наличии во временной шкале ЯМР конформеров, существование которых обусловлено заторможенным вращением вокруг связей $\text{C}^G\text{-N}^\epsilon$ и $\text{C}^G\text{-N}^\omega$ гуанидиновой группы аргинина в пептиде $\text{H-Phe-Arg(Phe-)-OH}$. Усиление этого вращения при нагревании приводит к уширению линий и изменению их химических сдвигов. В спектрах ^1H -ЯМР при насыщении сигнала аналогичного протона (10.10 м. д.) наблюдается изменение интенсивности сигнала аналогичного протона (9.65 м. д.) другого изомера.

Анализ спектра пептида $\text{H-Phe-Arg(Phe-)}_2\text{-OH}$ (рис. 2а) позволяет сделать вывод, что присоединение двух остатков фенилаланина происходит по одному и тому же атому азота N^ω в гуанидиновой группе аргинина. Доказательством этого является отсутствие в спектре тетрапептида сигналов от протона N^ωH гуанидиновой группы (ср. рис. 2а и 2в), при этом сигналы протонов C^αH (4.71 м. д.), C^βH (3.09 м. д.) и $\text{N}^\epsilon\text{H}_2$ -групп (8.31 м. д.) остатков Phe^3 и Phe^3 полностью совпадают, что указывает на симметрию структуры химерного тетрапептида. Для дополнительного подтверждения структуры выделенных соединений были

определены их молекулярные массы (методом ESI-MS), которые соответствовали расчетным.

Вероятно, на стадии деблокирования α -аминогруппы в результате обработки пиперидином, имеющим pK_a 11.12, происходит частичное депротонирование гуанидиновой группы, что в присутствии большого избытка ацилирующего агента и приводит к образованию описанных побочных продуктов. Действительно, из литературных данных известна способность гуанидиновой группы аргинина вступать в реакции ацилирования [1, 2]. Введение дополнительной стадии протонирования гуанидиновой группы путем промывки пептидполимера раствором избытка бромгидрата пиридина в диметилформамиде после деблокирования аминогруппы и перед последующей стадией конденсации позволяет полностью предотвратить протекание этой побочной реакции. Полученный таким образом дипептид H-Phe-Arg-OH после отщепления от пептидполимера обработкой 95% водной TFA, по данным ВЭЖХ, имел 97% чистоту (рис. 1в). Его структура подтверждена данными ^1H -ЯМР-спектроскопии (рис. 2б).

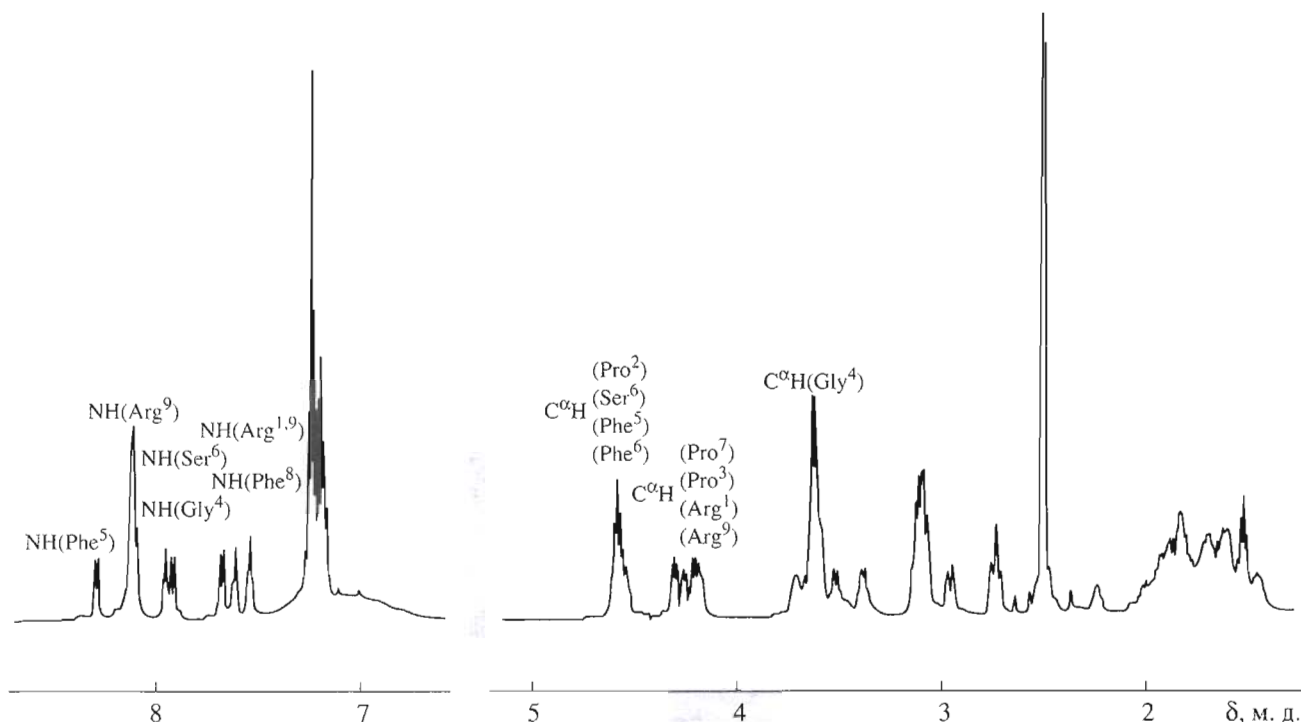


Рис. 3. Спектр ^1H -ЯМР брадикинина в $\text{DMSO-}d_6$ при 27°C .

Следует отметить, что в случае посадки на полимер *S*-концевого аргинина с защищенной протонированием гуанидиновой группой, необходимо добиваться максимальной степени замещения гидроксиметильных групп, поскольку стандартная процедура обработки полимера уксусным ангидридом, применяемая для блокирования непрореагировавших с аминокислотой гидроксильных групп, в данном случае невозможна. В результате такой обработки при синтезе *S*-концевого дипептида брадикинина H-Phe-Arg-OH исходя из $\text{Fmoc-Arg(H}^+\text{)-OP}$ со степенью замещения 49% (0.22 ммоль/г) нами был выделен и охарактеризован методом ^1H -ЯМР побочный продукт, представляющий собой H-Phe-Arg(Ac)-OH .

Учитывая полученные результаты, дальнейший синтез брадикинина проводили, включив в протокол дополнительную стадию протонирования после каждого деблокирования аминокислоты. Твердофазный синтез проводили в ручном варианте последовательным наращиванием пептидной цепи DIPCDI/NOBt-методом. Избыток активируемой Fmoc -аминокислоты по отношению к пептидилполимеру составлял 5 эквивалентов. Полноту протекания реакции конденсации проверяли нингидриновым тестом [19] и при необходимости повторяли конденсацию. Контрольное отщепление фрагментов от пептидилполимера проводили через каждые два шага, оценивая содержание продукта по данным аналитической

ВЭЖХ. Содержание des-Arg^1 -брадикинина в образце перед последней стадией конденсации составляло 96%.

N-Концевой аргинин был присоединен двукратной конденсацией BOP-методом. Как следует из литературных данных, использование BOP-реагента [20] позволяет значительно увеличить скорость реакции конденсации. При проведении конденсации с помощью реагента Кастро в реакционную смесь добавляют несколько эквивалентов основания [20–22]. В случае использования Fmoc -аргинина со свободной гуанидиновой группой, как и предполагалось, роль необходимого для активации карбоксильной группы органического основания выполняет сама гуанидиновая группировка ($\text{p}K_a$ 12.5). Известно, что избыток основания в реакционной смеси способствует рацемизации, отсутствие же органического основания при синтезе со свободной гуанидиновой группой дает в этом случае дополнительное преимущество.

Содержание брадикинина в сыром продукте после отщепления от пептидилполимера и деблокирования обработкой 95% водной TFA, по данным аналитической ВЭЖХ, составило 92%, выход – 65% (в расчете на стартовую аминокислоту). Структура полученного брадикинина после очистки с помощью препаративной ВЭЖХ на обращенной фазе в условиях, описанных в “Эксперимент. части”, подтверждена данными ^1H -ЯМР (рис. 3) и ESI-MS.

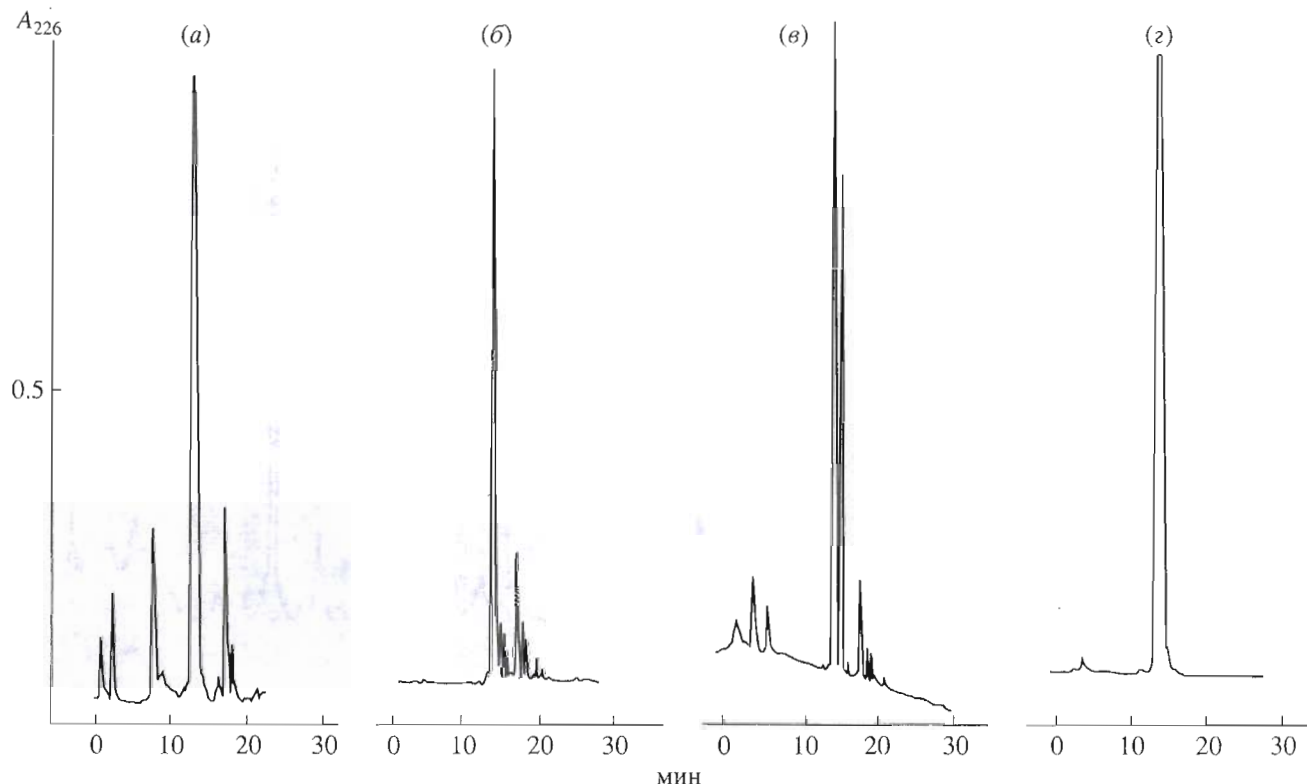


Рис. 4. Профили аналитической ВЭЖХ (колонка Ultrasphere ODS, 5 мкм (4.6 × 250 мм), градиент 2, см. “Эксперимент. часть”): сырого продукта – октапептида Н-Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-OH, полученного в результате синтеза DIPCDI/НОВt-методом с использованием Fmoc-Arg(Pmc)-OH (а); сырого продукта – октапептида, полученного в результате синтеза ВОР-методом без защиты гуанидиновой группы аргинина (б); искусственной смеси полностью-L-октапептида и его D-Arg¹-аналога (в); L-октапептида после препаративной ВЭЖХ-очистки (г).

Параллельно мы проводили отработку метода введения аргинина в наращиваемую пептидную цепь на примере синтеза октапептидного фрагмента 584–591 последовательности трансмембранного белка gp41 ВИЧ-1 Н-Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-OH.

В синтезе использовали Fmoc-стратегию (прибор Applied Biosystems Model 431A). Полимерным носителем служил Fmoc-аминоацтилолимер Ванга (Fmoc-Tyr(Bu)^t-OP) с содержанием аминокислоты 0.65 ммоль/г. Fmoc-группу удаляли обработкой 20% раствором пиперидина в DMF. Для защиты боковых функциональных групп аминокислот, за исключением гуанидиновой, применяли *трет*-бутильную группу. Избыток вводимой Fmoc-аминокислоты по отношению к пептидилполимеру составлял 10 эквивалентов.

Первоначально мы DIPCDI/НОВt-методом провели синтез октапептида с Pmc-защитой гуанидиновой группы обоих остатков аргинина. По окончании синтеза пептид отщепляли от носителя и деблокировали обработкой в течение 1.5 ч смесью реагентов: трифторуксусная кислота – 82.5%, фенол – 5%, вода – 5%, тианизол – 5%, этандитиол – 2.5% [23]. Содержание целевого

продукта, по данным аналитической ВЭЖХ, составило 85% (рис. 4а). Пептид, полученный после очистки препаративной ВЭЖХ на обращенной фазе с выходом 59%, имел корректный аминокислотный состав. Его структура подтверждена данными ESI-MS.

Далее нами было проведено сопоставление двух методов введения аргинина со свободной гуанидиновой группой в наращиваемую пептидную цепь: DIPCDI/НОВt и ВОР. В первом случае гуанидиновую группу протонировали путем предварительной обработки Fmoc-производного аргинина эквивалентом бромгидрата пиридина и далее проводили конденсацию стандартным DIPCDI/НОВt-методом. При синтезе ВОР-методом мы использовали эквивалентные количества ВОР-реагента и Fmoc-аргинина без дополнительного протонирования гуанидиновой группы и без добавления в реакционную смесь основания.

В проведенных экспериментах варьировали метод и число повторов стадии конденсации при присоединении Fmoc-аргинина в каждое из положений. Все остальные Fmoc-аминокислоты были присоединены DIPCDI/НОВt-методом однократной конденсацией. Пептиды деблокировали и от-

Таблица 2. Сопоставление результатов синтеза H-Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-OH при варьировании условий конденсации на стадиях введения остатков Arg1 и Arg7

Стадия введения				Содержания целевого продукта, по данным ВЭЖХ, %
Arg1		Arg7		
метод конденсации*	число повторов	метод конденсации*	число повторов	
DIPCDI/HOBt	2	DIPCDI/HOBt	2	55
DIPCDI/HOBt	3	DIPCDI/HOBt	2	64
BOP	1	DIPCDI/HOBt	2	58
BOP	1	BOP	2	65
–	–	DIPCDI/HOBt	2	67**
–	–	BOP	1	70**
BOP	2	BOP	1	67
BOP	2	BOP	2	80

* Остатки остальных аминокислот вводили DIPCDI/HOBt-методом.

** Указано содержание H-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-OH, по данным ВЭЖХ.

щепляли от пептидилполимера действием 95% водной TFA. Содержание целевого продукта в каждом случае оценивали по данным аналитической ВЭЖХ. Примеси, выделенные в результате очистки препаративной ВЭЖХ, были охарактеризованы данными ESI-MS и количественного аминокислотного анализа и представляли собой пептиды с делециями аргинина в положениях 1 и/или 7. Следует отметить, что в данных экспериментах в отличие от синтеза брадикинина дополнительная стадия протонирования не проводилась. Результаты проведенных синтезов представлены в табл. 2.

Как видно из приведенных данных, наилучший результат был получен при двукратном проведении конденсации BOP-методом на обеих стадиях введения остатка аргинина. При этом аргинин в положении 1 присоединялся хуже, что можно объяснить влиянием предшествующей ему стерически затрудненной аминокислотной последовательности Ile-Leu.

Для оценки степени возможной рацемизации при применении перечисленных методов синтеза нами был синтезирован аналог H-D-Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-OH. Синтез проводили с использованием Fmoc-стратегии на приборе Applied Biosystems Model 431A стандартным DIPCDI/HOBt-методом, N-концевой D-аргинин вводили двукратной конденсацией BOP-методом. Полученный пептид подвергали препаративной ВЭЖХ-очистке, структуру подтверждали с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии. Методом аналитической ВЭЖХ было показано полное отсутствие в целевых продуктах D-изомера (см. рис. 4б и в).

Таким образом, нами продемонстрирована возможность успешного введения аргинина без

дополнительной защитной группы для гуанидиновой функции в условиях Fmoc-стратегии ТФС.

Для посадки Fmoc-Arg(H⁺)-OH на полимер Ванга можно рекомендовать карбодиимид в сочетании с 1-метилимидазолом, при этом необходимо добиваться максимально возможной полноты присоединения аминокислоты к полимеру и регулировать содержание стартовой аминокислоты на полимере, только варьируя содержание гидроксиметильных групп в исходном полимере. Предлагаемый метод присоединения Fmoc-Arg(H⁺)-OH к смоле не приводит к заметной рацемизации или удвоению остатка аргинина.

Для введения Fmoc-Arg-OH без защиты гуанидиновой группы в наращиваемую пептидную цепь оптимально применение BOP-метода без добавления основания в реакционную смесь. Так, результат, полученный в синтезе H-Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-OH, сопоставим с результатом синтеза с использованием Fmoc-Arg(Pmc)-OH: содержание целевого вещества, по данным аналитической ВЭЖХ, в сыром продукте составило 80 и 85% соответственно.

Для предотвращения возможного ацилирования гуанидиновой группы аргинина в пептидилполимере при синтезе DIPCDI/HOBt-методом мы рекомендуем включать дополнительную стадию протонирования после каждой стадии деблокирования Fmoc-группы.

Сочетание всех этих методов и приемов в синтезе брадикинина позволило нам получить целевой продукт высокой степени чистоты: содержание пептида в сыром продукте, по данным аналитической ВЭЖХ, составило 92%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали N^α -Fmoc-производные аминокислот *L*-ряда и *D*-аргинин (Bachem, Fluka (Швейцария) и Reanal (Венгрия)), DIPCDI, BOP, 1-метилимидазол, DMAP, HOBT, EDT (Fluka, Швейцария), полимер Ванга (сополимер стирола с 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой) и Fmoc-Тур(Bu^t)-полимер Ванга (Bachem, Швейцария).

DMF перегоняли над CaO, затем с нингидрином в вакууме и сушили над молекулярными ситами 4 Å, пиперидин перегоняли над NaOH, хлористый метилен промывали концентрированной серной кислотой и водой, сушили и перегоняли над CaCl₂, затем над гидридом кальция.

Бромгидрат пиридина получали, пропуская ток HBr через охлажденный раствор пиридина в гексане, выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре гексаном и сушили в вакуум-эксикаторе.

ТСХ осуществляли на хроматографических пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в смеси растворителей: хлороформ–метанол–32% уксусная кислота, 60 : 45 : 20. Вещества на пластинках обнаруживали с помощью хлорбензидинового реагента [24].

Аналитическую ВЭЖХ проводили на приборе Gilson (Франция) на колонках Nucleosil C-18, 5 мкм (4.6 × 150 мм) (Alltech, США) и Ultrasphere ODS, 5 мкм (4.6 × 250 мм) (Beckman, США). Элюенты: буфер А – 0.1% TFA в воде, буфер Б – 80% ацетонитрил в буфере А. Используемые градиенты концентраций: от 0 до 30% буфера Б за 30 мин (градиент 1), от 10 до 70% буфера Б за 30 мин (градиент 2). Скорость потока 1 мл/мин, детекция при длине волны 226 нм. Препаративную ВЭЖХ осуществляли на приборе Beckman (США) на колонке Диасорб С-16, 10 мкм (24 × 250 мм), детекция при длине волны 226 нм. Элюенты те же, что и в случае аналитической ВЭЖХ, скорость потока 10 мл/мин. Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил (Technopharm, Россия).

Аминокислотный анализ пептидов после гидролиза в 6 н. HCl, содержащей 2% фенола, при 110°C в течение 24 ч проводили на автоматическом анализаторе Biotronik LC 5001 (Германия).

Масс-спектрометрию осуществляли методом ESI-MS на квадрупольном масс-спектрометре Finnigan MAT TSQ 700 (Германия) с электроспрейным ионным источником API (Finnigan MAT).

Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре WM-500 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 500 МГц при 27°C в DMSO-*d*₆. Химические сдвиги измерялись относительно стандарта тетраметилсилана.

Присоединение Fmoc-Arg(H⁺)-ОН к полимеру Ванга. Смесь 0.892 г (2.25 ммоль) Fmoc-Arg-ОН и 0.405 г (2.25 ммоль) бромгидрата пиридина растворяли в 5 мл DMF, охлаждали до 0°C и добавляли 0.348 мл (2.25 ммоль) DIPCDI, через 5 мин раствор приливали к 1.00 г полимера Ванга с содержанием гидроксиметильных групп 0.45 ммоль, после чего добавляли 0.125 мл (1.57 ммоль) 1-метилимидазола. Перемешивали 2 ч при 20°C, смолу отфильтровывали, промывали на фильтре DMF (10 мл × 3), метанолом (10 мл × 3), хлористым метилом (10 мл × 3), сушили в вакуум-эксикаторе. Содержание Fmoc-Arg в полимере, определенное по методике, указанной ниже, составило 0.42 ммоль/г (степень замещения – 93%).

Присоединение с использованием других катализаторов проводили аналогичным образом с 5-кратным избытком Fmoc-Arg(H⁺)-ОН и DIPCDI, варьируя количество катализатора и время обработки (см. табл. 1).

Степень замещения смолы определяли спектрофотометрически. К 20 мг полученного Fmoc-Arg-полимера добавляли 5 мл 20% раствора пиперидина в DMF и перемешивали 20 мин при 20°C. Смолу отфильтровывали, отбирали аликвоту фильтрата и определяли оптическое поглощение раствора образовавшегося *N*-(9-флуоренилметил)пиперидина при 301 нм. Степень замещения смолы вычисляли по формуле: $A_{301} \times V(\text{мл})/7800 \times W(\text{г})$ [25].

H-Phe-*D*-Arg-ОН. К суспензии 174 мг (1 ммоль) H-*D*-Arg-ОН в DMF приливали при охлаждении раствор 463 мг (1.2 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира Boc-Phe в DMF, перемешивали 24 ч при 20°C. DMF упаривали, остаток растворяли в хлороформе и подвергали очистке на колонке с силикагелем. Хроматографию проводили с использованием ступенчатого градиента хлороформ – этанол от 0 до 100% этанола, увеличивая содержание этанола на каждой ступени на 10%. Объем элюента на каждой ступени соответствовал трем свободным объемам колонки. Получено 380 мг (90%) Boc-Phe-*D*-Arg-ОН; R_f 0.74.

380 мг Boc-Phe-*D*-Arg-ОН растворяли в 10 мл 95% водной TFA и перемешивали 1 ч при 20°C. TFA упаривали, остаток растирали с эфиром, отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром. Выход 279 мг (87%); R_f 0.46; R_t 15.38 мин (колонка Nucleosil C-18, 5 мкм (4.6 × 150 мм), градиент 1).

H-Phe-Arg-ОН был получен по методике, аналогичной для синтеза H-Phe-*D*-Arg-ОН. Выход 255 мг (79%); R_f 0.46; R_t 14.30 мин (колонка Nucleosil C-18, 5 мкм (4.6 × 150 мм), градиент 1).

H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-ОН (брадикинин). Твердофазный синтез проводили в ручном варианте исходя из 1.0 г Fmoc-Arg-полимера с содержанием аминокислоты 0.42 ммоль/г последовательным наращиванием пептидной цепи

DIPCDI/НОВt-методом. Синтетический цикл включал в себя: 1) 20-минутную активацию присоединяемой Fmoc-аминокислоты (5 экв.) с DIPCDI и НОВt (по 5 экв.) в 5 мл DMF; 2) деблокирование α -аминогрупп обработкой 20% раствором пиперидина в DMF (5 мл \times 2) в течение 20 мин; 3) промывку пептидилполимера DMF (10 мл \times 4, по 5 мин); 4) дополнительную промывку пептидилполимера раствором бромгидрата пиридина (0.42 ммоль) в 5 мл DMF в течение 10 мин; 5) конденсацию активированной Fmoc-аминокислоты (5 экв.) с пептидилполимером в течение 2 ч; 6) серию промывок пептидилполимера DMF (10 мл \times 4, по 5 мин), хлористым метиленом (10 мл \times 2, по 5 мин); 7) контроль полноты замещения аминогрупп при присоединении очередной Fmoc-аминокислоты осуществляли с помощью нингидринового теста [19], при положительном результате теста проводили повтор стадии конденсации. Двукратно конденсацию осуществляли при присоединении следующих аминокислот: Pro2, Gly4, Ser6.

N-Концевой Arg1 присоединяли двукратной конденсацией BOP-методом: соотношение BOP-реактанта и активируемого Fmoc-Arg-OH 1 : 1, растворитель – DMF, время преактивации 2–3 мин, время одной конденсации 1 ч.

После окончания синтеза и деблокирования α -аминогруппы пептидилполимер промывали на фильтре DMF, хлористым метиленом и сушили в вакуум-эксикаторе. После отщепления пептида от пептидилполимера и деблокирования обработкой 10 мл 95% водной TFA в течение 1.5 ч полимер отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме при 40°C, остаток растирали с охлажденным безводным эфиром, отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе. Было получено 389 мг сырого продукта, содержание брадикинина в котором составило 92%, по данным аналитической ВЭЖХ, R_f 15.43 мин (колонка Ultrasphere ODS, 5 мкм (4.6 \times 250 мм), градиент 2).

Очистку пептида проводили методом препаративной ВЭЖХ. Градиент буфера Б составлял от 0 до 10% за 5 мин, от 10 до 50% за 80 мин. Выход 307 мг (69% в расчете на стартовую аминокислоту). Структура полученного брадикинина подтверждена данными $^1\text{H-NMR}$ (см. рис. 3). Молекулярная масса полученного соединения, по данным ESI-MS, составила 1060, что соответствует расчетным данным.

H-Phe-Arg-Arg-OH. Твердофазный синтез проводили в ручном варианте исходя из 0.24 г (0.10 ммоль) Fmoc-Arg-полимера с содержанием аминокислоты 0.42 ммоль/г. Избыток присоединяемой аминокислоты составлял 5 экв. Fmoc-Arg-OH присоединяли двукратной конденсацией BOP-методом по методике, аналогичной для брадикинина. Fmoc-Phe-OH присоединяли однократной конденсацией DIPCDI/НОВt-методом. После отщепления от полимера обработкой 95% водной

TFA в течение 1.5 ч выделенный стандартным образом сырой продукт содержал, по данным аналитической ВЭЖХ, 87% H-Phe-Arg-Arg-OH, R_f 16.1 мин (колонка Nucleosil C-18, 5 мкм (4.6 \times 150 мм), градиент 1). Полученный пептид подвергали очистке с помощью препаративной ВЭЖХ; градиент буфера Б от 0 до 40% за 80 мин. Выход 35 мг (73%); R_f 0.09.

H-Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-OH. Твердофазный синтез проводили с использованием Fmoc-стратегии на приборе Applied Biosystems Model 431A. В качестве носителя использовали Fmoc-Tyr(Bu^t)-полимер Ванга с содержанием аминокислоты 0.65 ммоль/г, в количестве 0.1 ммоль для каждого эксперимента. Синтез проводили по стандартной программе, используя 10-кратный избыток активируемой Fmoc-аминокислоты и однократную конденсацию в ходе каждого цикла. Исключение составляли Ile2, который присоединяли двукратной конденсацией, а также Arg1 и Arg7, методы присоединения которых варьировали как это описано выше. Синтетический цикл включал в себя: 1) 20-минутную активацию присоединяемой Fmoc-аминокислоты (1 ммоль) с эквивалентным количеством DIPCDI и НОВt в DMF; 2) деблокирование α -аминогрупп обработкой 20% раствором пиперидина в DMF в течение 17 мин; 3) конденсацию активированной Fmoc-аминокислоты (1 ммоль) с пептидилполимером в течение 37 мин; 4) все необходимые промежуточные промывки пептидилполимера. После окончания синтеза и деблокирования α -аминогруппы пептидилполимер промывали на фильтре хлористым метиленом и сушили в вакуум-эксикаторе. Пептид отщепляли от пептидилполимера с одновременным деблокированием боковых функциональных групп обработкой 10 мл смеси реагентов: TFA – 82.5%, фенол – 5%, вода – 5%, тиоанизол – 5%, этандитиол – 2.5%, в течение 1.5 ч. После этого полимер отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме при 40°C, остаток растирали с охлажденным безводным эфиром, отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе.

Содержание целевого продукта в сыром продукте, по данным аналитической ВЭЖХ, составило 85%. R_f 13.60 мин (колонка Ultrasphere ODS, 5 мкм (4.6 \times 250 мм), градиент 2).

Полученный пептид подвергали препаративной ВЭЖХ-очистке на обращенной фазе; градиент буфера Б от 0 до 20% за 10 мин, от 20 до 50% за 60 мин. Выход 60 мг (59% в расчете на стартовую аминокислоту). Аминокислотный состав: Arg 2.03 (2), Ile 0.79 (1), Leu 0.87 (1), Ala 1.0 (1), Val 1.02 (1), Glu 1.10 (1), Tyr 0.98 (1). Молекулярная масса полученного соединения, по данным ESI-MS, составила 1019, что соответствует расчетным данным.

H-D-Arg-Ile-Leu-Ala-Val-Glu-Arg-Tyr-OH синтезировали аналогично описанному выше синтезу

L-аналога, исходя из 0.1 ммоль стартовой аминокислоты. Остаток Arg7 вводили двукратной конденсацией DIPCDI/НОВt-методом с защитой гуанидиновой группы протонированием, N-концевой D-аргинин – двукратной конденсацией ВОР-методом. Содержание целевого вещества в сыром продукте после отщепления от полимера обработкой 95% водной TFA в течение 1.5 ч, по данным аналитической ВЭЖХ, составляло 76%; R_t 14.38 мин (колонка Ultrasphere ODS, 5 мкм (4.6 × 250 мм), градиент 2). После препаративной ВЭЖХ-очистки выход составил 51 мг (50% в расчете на стартовую аминокислоту). Структура подтверждена методом ¹H-ЯМР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rink H., Sieber P., Raschdorf F. // *Tetrahedron Lett.* 1984. V. 25. P. 621–624.
2. Photaki I., Yiotakis A. // *J. Chem. Soc. Perkin I.* 1976. P. 259–263.
3. Siber P. // *Tetrahedron Lett.* 1987. V. 28. P. 1637–1640.
4. Rubina A.Yu., Bepalova Z.D., Ovchinnikov M.V., Bushuev V.N., Popletaeva E.B., Efremov E.E. // *Mendeleev Communication.* 1996. № 4. P. 159–161.
5. Coy D.H., Branyas N. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1979. V. 14. P. 339–343.
6. Atherton E., Cammish L.E., Goddard P., Richards J.D., Sheppard R.C. // *Peptides* / Ed. Ragnarsson U. Stockholm: Almquist and Wiksell. Int., 1984. P. 153–156.
7. Евстигнеева Р.П., Беспалова Ж.Д., Палькеева М.Е. // Докл. РАН. 1998. Т. 360. С. 829–833.
8. 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.
9. Bepalova Z.D., Pekelis B.L., Deigin V.I., Yarova E.P., Saks T.P., Ovchinnikov M.V., Efremov E.E., Sepeotov N.F., Korotkov A.M., Molokoedov A.S. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1990. V. 55. P. 2537–2554.
10. Wang S.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 1973. V. 95. P. 1328–1333.
11. Wang S.S. // *J. Org. Chem.* 1975. V. 40. P. 1235–1239.
12. Atherton E., Benoiton N.L., Brown E., Sheppard R.C., Williams B.J. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981. № 5. P. 336–337.
13. Atherton E., Logan C.J., Sheppard R.C. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1981. P. 538–546.
14. Stadler P.A. // *Helv. Chim. Acta.* 1978. V. 61. P. 1675–1679.
15. Bodanszky M., Fagan D.T. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1977. V. 10. P. 375–379.
16. Connors K.A., Pandit N.K. // *Anal. Chem.* 1978. V. 50. P. 1542–1545.
17. Hofle V.G., Steglich W., Vorbruggen H. // *Angew. Chem.* 1978. V. 90. P. 602–615.
18. Sieber P. // *Tetrahedron Lett.* 1987. V. 28. P. 6147–6150.
19. Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. // *Anal. Biochem.* 1970. V. 34. P. 595–598.
20. Castro B., Dormoy J.R., Evin G., Selve C. // *Tetrahedron Lett.* 1975. V. 14. P. 1219–1222.
21. Seyer R., Aumelas A., Caraty A., Rivaille P., Castro B. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990. V. 35. P. 465–472.
22. Fournier A., Wang C.T., Felix A.M. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1988. V. 31. P. 86–97.
23. King D.S., Fields C.G., Fields G.B. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990. V. 36. P. 255–266.
24. Reindel F., Hoppe W. // *Naturwissenschaften.* 1953. V. 40. P. 221–223.
25. Meienhofer J., Waki M., Heimer E.P., Lambross T.J., Makofske R.S., Chang C.D. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1979. V. 13. P. 33–42.

The Solid Phase Synthesis of Peptides Containing an Arginine Residue with an Unprotected Guanidine Group

A. Yu. Rubina[#], Zh. D. Bepalova, and V. N. Bushuev

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

A new variant of the solid phase synthesis of arginine-containing peptides was proposed. The conditions for the attachment to the Wang polymer of N^α-Fmoc-arginine containing a protonated guanidine group were found. We demonstrated that this attachment is accompanied by neither racemization nor the attachment of the second Arg residue. Side reactions involving the guanidine group of arginine were studied, and methods for their prevention were proposed. The comparison of the carbodiimide method with a 1-hydroxybenzotriazole additive and a modified method with the use of Kastro's reagent for the introduction of N^α-Fmoc-Arg residue with the unprotected guanidine group into the growing peptide chain demonstrated the advantages of the second method. Bradykinin and a peptide corresponding to the 584-591 sequence of the transmembrane gp41 from HIV-1 were synthesized by the method proposed here.

Key words: arginine, guanidine group; peptides, solid phase synthesis; Kastro reagent; ¹H NMR spectroscopy; bradykinin

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

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 4. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.