



УДК 547.964.4:577.112.6

## ОПТИМИЗАЦИЯ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА ИНГРАМОНА – ПЕПТИДНОГО АНТАГОНИСТА МОНОЦИТАРНОГО ХЕМОТАКСИЧЕСКОГО БЕЛКА 1 (MCP-1) ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. М. В. Сидорова\*, #, У. С. Дудкина\*, Д. В. Авдеев\*, М. Е. Палькеева\*, А. С. Молокоедов\*, М. В. Овчинников\*, А. А. Азьмуко\*, С. Б. Гречишников\*\*, Е. В. Кудрявцева\*\*, В. Н. Бушуев\*, Т. И. Арефьева\*

\*ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии” Минздрава РФ, Россия, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

\*\*ЗАО “Синтез пептидов”, Россия, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

Поступила в редакцию 20.01.2020 г.

После доработки 29.01.2020 г.

Принята к публикации 31.01.2020 г.

Оптимизирован способ твердофазного синтеза (ТФС) инграмона H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH – пептидного антагониста моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) человека, обладающего противовоспалительным действием. Изучены побочные продукты ТФС этого пептида с использованием Fmoc-методологии, их структура установлена спектроскопией <sup>1</sup>H-ЯМР и масс-спектрометрией и подтверждена встречным синтезом. Найдены методические приемы, позволяющие минимизировать образование примесей в ходе ТФС инграмона. Разработана воспроизводимая методика получения инграмона, позволяющая свести к минимуму образование побочных продуктов – соответствующих [Asi<sup>4</sup>]-, [D-Asp<sup>4</sup>]- и [βAsp<sup>4</sup>]пептидов – в ходе его твердофазного синтеза.

*Ключевые слова:* моноцитарный хемотаксический белок 1 человека, инграмон, твердофазный синтез, транспептидация, спектроскопия ЯМР

DOI: 10.31857/S0132342320040272

### ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что 12-членный пептидный фрагмент (65–76) моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) человека H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH является его антагонистом [1, 2]. Этот пептид получил название инграмон<sup>1</sup> (ингибитор гранулоцитов и моноцитов). В серии экспериментальных работ, выполненных на грызунах и приматах, до-

казана способность этого пептида подавлять миграцию моноцитов и оказывать противовоспалительное действие [3–5], установлено, что инграмон, меченный технецием (<sup>99m</sup>Tc), накапливается в очаге воспаления [4].

В модели экспериментального рестеноза артерий после ангиопластики ежедневные инъекции инграмона замедляли формирование неointимы [6]. Показано, что противовоспалительное действие инграмона реализуется благодаря конкурированию с MCP-1 за связывание с гликозаминогликанами на поверхности клеток и в составе внеклеточного матрикса; т. о. препарат препятствует созданию концентрационного градиента хемокина, необходимого для привлечения моноцитов в очаг воспаления [7, 8]. Результаты доклинического токсикологического исследования показали, что препарат нетоксичен, не обладает мутагенными, тератогенными свойствами, не влияет на репродуктивную функцию, не проявляет аллергизирующих и иммунотоксических свойств. Безопасность инграмона была подтверждена у здоровых добровольцев и в клинических исследованиях, в том числе у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Противовоспалительная ак-

Сокращения: Asi – аспартид; βAsp – остаток аспарагиновой кислоты с β-карбоксамидной связью; Boc – трет-бутилоксикарбонил; Bu<sup>t</sup> – трет-бутил; 2-СТС – 2-хлортрилхлорид; DBU – 1,8-дизабицикло[5.4.0]-ундец-7-ен; DCM – дихлорметан; DIC – N,N'-диизопропилкарбодимид; DIEA – N,N'-диизопропилэтиламин; DMF – диметилформамид; DMSO – диметилсульфоксид; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; HOBt – 1-гидроксибензотриазол; MALDI – матрично активированная десорбция/ионизация; MS-масс-спектрометрия; MePip – 4-метилпиперидин; NMM – N-метилморфолин; TBVTU – N,N,N',N'-тетраметил-О-(бензотриазол-1-ил)уруния тетрафторборат; TFA – трифторуксусная кислота; TIS – триизопропилсилан; Trt – тритил; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ТФС – твердофазный синтез.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 414-67-16, факс: +7 (495) 414-67-86, эл. почта: peptide-cardio@yandex.ru).

<sup>1</sup> № регистрации 425414 от 13.12.2010.

тивность инграмона была доказана у пациентов с ИБС, стентированием коронарных артерий: дополнительное к стандартной терапии ежедневное внутривенное введение препарата до и после процедуры ангиопластики препятствовало подъему концентрации в крови белков острой фазы [8, 9].

Данная работа является продолжением наших исследований инграмона и посвящена изучению состава образующихся в ходе его ТФС примесей, поискам путей минимизации побочных процессов и созданию оптимизированной методики его синтеза.

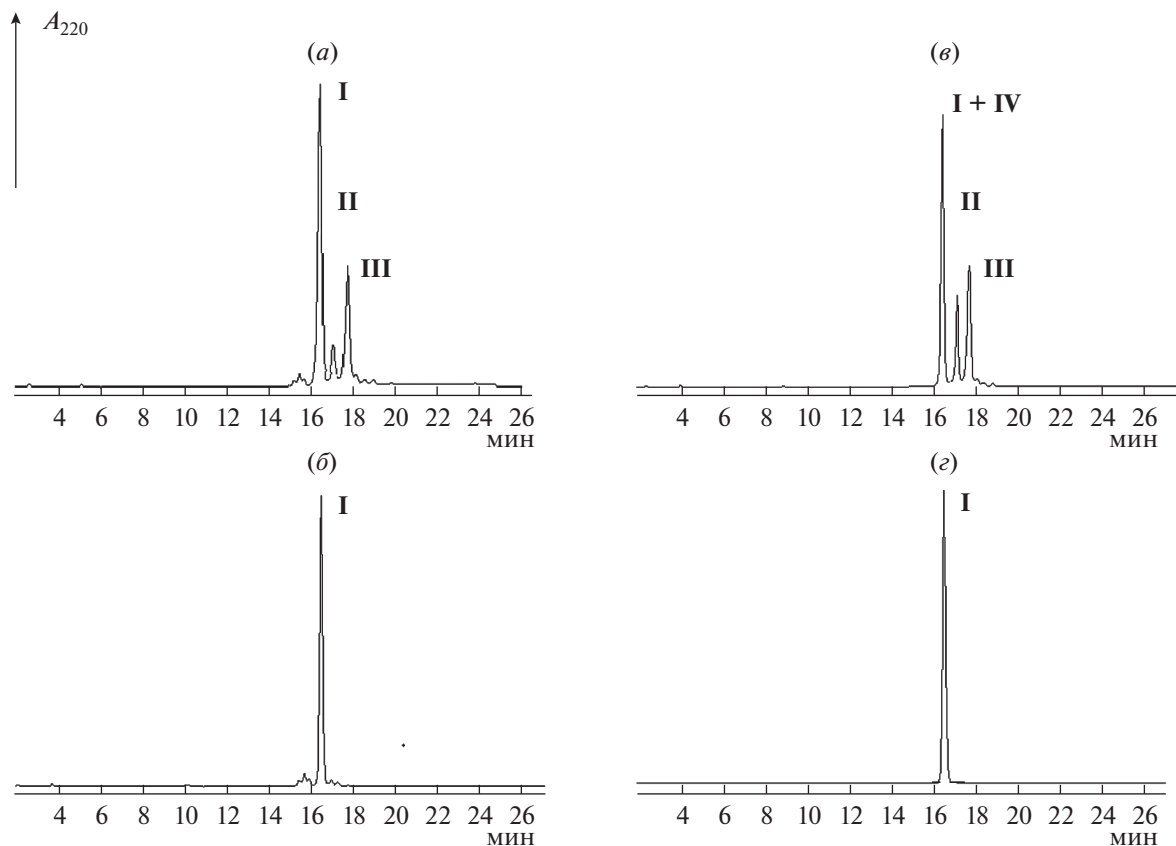
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Изучение структуры примесей, образующихся при ТФС инграмона*

Для разработки схемы ТФС инграмона за основу была принята его Fmoc-методология. Для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот были выбраны следующие защиты: Boc — для ε-аминогрупп лизина;  $Bu^t$  — для карбоксильных групп аспарагиновой кислоты и гидроксильных групп треонина и Trt — для карбоксамидных функций глутамина и имидазольного кольца гистидина. Автоматический ТФС инграмона был проведен по стандартной программе автоматического пептидного синтезатора “Tribute UV” с использованием раствора 2% 4-MePip/2% DBU/DMF для отщепления Fmoc-защит и метода урониевых солей (TBTU/NMM) для создания амидных связей. На рис. 1а представлен профиль аналитической ВЭЖХ неочищенного продукта ТФС. Наиболее существенные примеси — соединения (II) и (III) на рис. 1а, были выделены и проанализированы с помощью масс-спектрометрии и  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии. Было установлено, что оба примесных соединения являются продуктами побочных реакций по остатку  $\text{Asp}^4$ , вещество, соответствующее пику II, имело корректную для целевого продукта молекулярную массу (1411.8 Да) и, следовательно, являлось либо оптическим, либо стерическим его изомером. На основании данных спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР, представленных в табл. 1, можно предполагать, что это соединение является диастереомерным [*D*- $\text{Asp}^4$ ]инграмоном, т.к. наиболее заметные изменения наблюдаются у сигнала протона при хиральном α-углеродном атоме остатка  $\text{Asp}^4$ : в инграмоне — α-СН (4.58 м.д.), в побочном продукте — при 4.68 м.д. и амидного протона остатка  $\text{Lys}^5$ : в инграмоне — NH (7.79 м.д.), в побочном продукте — 8.08 м.д.

Соединение, соответствующее пику III (рис. 1а), имело молекулярную массу (1393.5 Да) на 18 Да меньше, чем у целевого инграмона. По всей вероятности, пептид (III) является продуктом дегидратации. В спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР этого вещества (см. табл. 1) присутствуют сигналы протонов всех ами-

нокислотных остатков, входящих в состав инграмона. Однако химические сдвиги сигналов ряда остатков побочного продукта отличаются от их значений в спектре целевого вещества (I). В первую очередь это относится ко всем сигналам остатков  $\text{Asp}^4$  и  $\text{Lys}^5$ . Так, сигналы  $\text{Asp}^4$  в спектре инграмона — α-СН (4.58 м.д.), β-СН<sub>2</sub> (2.52; 2.72 м.д.) и NH (8.43 м.д.), в побочном продукте наблюдаются соответственно при 4.49 для α-СН, 2.68; 3.05 для β-СН<sub>2</sub> и 8.80 м.д. для NH. Столь значительные различия (особенно сигналов протонов при β-углеродном атоме) можно объяснить модификацией боковой цепи остатка аспарагиновой кислоты. Сигналы протонов остатка  $\text{Lys}^5$  также сильно отличаются: в инграмоне — α-СН (4.25 м.д.), β-СН<sub>2</sub> (1.50; 1.635 м.д.) и NH (7.79 м.д.), в побочном продукте наблюдаются — α-СН (4.49 м.д.), β-СН<sub>2</sub> (1.83; 2.04 м.д.), сигнал амидного протона в спектре вещества (III) отсутствует. Отсутствие сигнала этого протона свидетельствует об образовании циклического продукта с участием α-аминогруппы остатка  $\text{Lys}^5$ . На основании данных масс-спектрометрии и  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии было сделано предположение, что соединение (III) представляет собой аспартиמיד — промежуточный циклический продукт α → β-перегруппировки амидной связи, образуемой карбоксильной группой остатка  $\text{Asp}^4$ . В результате щелочного гидролиза полученного вещества (III) (1% раствором гидроксида аммония при pH 9.0 в течение 16 ч) получают 2 продукта (рис. 2а), один из которых по ВЭЖХ совпадает с инграмоном, а второй, вероятно, представляет собой побочный изоаспартилпептид ([β $\text{Asp}^4$ ]инграмон) (IV). Известно, что при синтезе аспартилпептидов на стадиях отщепления Fmoc-защит действием вторичных аминов происходит образование циклического аспартимида, результатом чего является α → β-перегруппировка амидной связи с образованием изомерного побочного продукта [10]. Образование аспартимида, катализируемое кислотой или основанием, является одной из наиболее серьезных побочных реакций в ТФС пептидов, содержащих аспарагиновую кислоту, и до сих пор не разработана экономически эффективная стратегия ее подавления [11, 12]. На рис. 3 схематически представлена α → β-перегруппировка амидной связи, образуемой карбоксильной группой остатка  $\text{Asp}^4$  в последовательности инграмона. Степень протекания транспептидации главным образом определяется природой соседнего с аспарагиновой аминокислотой остатка, но зависит также и от конкретной аминокислотной последовательности пептида. Надо отметить, что последовательность Asp-Lys, судя по литературным данным [12], не является “критической” с точки зрения возможности протекания этой побочной реакции. В обзоре [12] показано, что при использовании Fmoc-методологии наиболее подвержены



**Рис. 1.** Аналитическая ВЭЖХ (условия 1, см. эксперим. ч.) продуктов синтеза инграмона (I): а – неочищенный продукт ТФС, полученный с использованием для отщепления Fmoc-защит смеси 2% DBU/2% 4-МеPip/DMF; б – неочищенный продукт, полученный с использованием деблокирующей смеси 25% 4-МеPip/DMF/0.1 М НОВт; в – искусственная смесь образцов целевого (I) и побочных продуктов (II)–(IV); г – пептид (I), очищенный с помощью препаративной ВЭЖХ (см. эксперимент. ч.) (условия 1). Детекция при 220 нм.

транспептидации последовательности Asp-Gly и Asp-Asn [12]. Однако мы применяли для деблокирования  $\alpha$ -аминогрупп сильное основание – DBU, которое может ускорить побочный процесс образования аспартимида [12, 13].

Следующим этапом работы было подтверждение структуры примесей, образующихся при ТФС инграмона. Для этого был проведен направленный ТФС [*D*-Asp<sup>4</sup>]инграмона (II) с использованием производного Fmoc-*D*-Asp(OBu')-ОН. Также был синтезирован [ $\beta$ Asp<sup>4</sup>]инграмон (IV) с использованием соответствующего производного с незамещенной  $\beta$ -карбоксильной группой Fmoc-Asp-OBu'. Изоаспартилпептид (IV) был необходим для идентификации продуктов гидролиза побочного [Asi<sup>4</sup>]инграмона (III) и ВЭЖХ-анализа продуктов ТФС. Полученные пептиды (II) и (IV) были очищены с использованием ВЭЖХ, их характеристики приведены в табл. 2. Сравнение соединения (II) с примесью, выделенной из пика II реакционной смеси синтеза инграмона, показало их идентичность (данные аналитической ВЭЖХ, <sup>1</sup>H-ЯМР и МС). На рис. 1в приведен профиль

ВЭЖХ искусственной смеси инграмона (I) и примесей: [*D*-Asp<sup>4</sup>]- (II), [Asi<sup>4</sup>]- (III) и [ $\beta$ Asp<sup>4</sup>]инграмона (IV). Видно, что инграмон (I) и [ $\beta$ Asp<sup>4</sup>]инграмон (IV) имеют одинаковое время удерживания при pH 3.0, а диастереомеры по остатку Asp<sup>4</sup> – соединения (I) и (II) – удается разделить.

Для анализа качества целевого пептида было очень важно подобрать условия ВЭЖХ, в которых изомерные пептиды с  $\alpha$ - и  $\beta$ -амидной связью, образуемой карбоксильной группой остатка Asp<sup>4</sup>, имеют разное время удерживания (делятся). Оказалось, что при повышении значения pH подвижной фазы в ВЭЖХ до 5.95 соединения (I) и (IV) удается разделить (см. рис. 2б). Следует отметить, что при pH 5.95 не происходит разделения диастереоизомерных пептидов (I) и (II). Поэтому для анализа качества инграмона необходимо проводить ВЭЖХ при разных значениях pH подвижной фазы. Сравнение продуктов гидролиза [Asi<sup>4</sup>]инграмона с продуктами встречного синтеза пептидов (I) и (IV) подтвердило наше предположение о том, что в ходе ТФС инграмона при деблокировании  $\alpha$ -аминогрупп раствором

Таблица 1. Химические сдвиги ( $\delta$ , м.д.) сигналов протонов интрамона и побочных продуктов (II)–(IV), образующихся в ходе его ТФС, в DMSO- $d_6$  при 300 К

Остаток	Интрамон (I)				[D-Asp <sup>4</sup> ]интрамон (II)				[Asi <sup>4</sup> ]интрамон (III)				[ $\beta$ Asp <sup>4</sup> ]интрамон (IV)							
	H <sub>N</sub>	H <sub><math>\alpha</math></sub>	H <sub><math>\beta</math></sub>	H <sub><math>\gamma</math></sub>	H <sub><math>\delta</math></sub>	H <sub>N</sub>	H <sub><math>\alpha</math></sub>	H <sub><math>\beta</math></sub>	H <sub><math>\gamma</math></sub>	H <sub><math>\delta</math></sub>	H <sub>N</sub>	H <sub><math>\alpha</math></sub>	H <sub><math>\beta</math></sub>	H <sub><math>\gamma</math></sub>	H <sub><math>\delta</math></sub>					
Asp <sup>1</sup>	8.16	4.13	2.80; 2.68			8.16	4.13	2.80; 2.68			8.18	4.13	2.80; 2.70			8.16	4.13	2.80; 2.68		
His <sup>2</sup>	8.73	4.66	3.10; 3.02			8.73	4.66	3.08; 2.99			8.75	4.68	3.12; 1.98			8.74	4.65	3.09; 3.00		
Leu <sup>3</sup>	8.18	4.31	1.45	1.58	0.87; 0.84	8.15	4.32	1.44	1.56	0.86; 0.83	8.22	4.28	1.48	1.56	0.87; 0.84	8.15	4.31	1.49	1.63	0.88; 0.84
Asp <sup>4</sup> / D-Asp <sup>4</sup> /Asi <sup>4</sup> / $\beta$ Asp <sup>4</sup>	<b>8.43</b>	<b>4.58</b>	<b>2.72</b> ; <b>2.52</b>			<b>8.46</b>	<b>4.63</b>	<b>2.68</b> ; <b>2.52</b>			<b>8.80</b>	<b>4.49</b>	<b>3.05</b> ; <b>2.68</b>			<b>8.365</b>	<b>4.54</b>	<b>2.66</b> ; <b>2.57</b>		
Lys <sup>5</sup>	7.79	4.25	1.635;	1.28;	1.52	8.08	4.30	1.68;	1.29	1.52	–	4.49	2.04;	1.29	1.49	8.17	4.266	1.65;	1.29	
Gln <sup>6</sup>	8.14	4.31	1.90; 1.78	2.14		8.27	4.29	1.92; 1.79	2.15		8.05	4.27	1.86; 1.74	2.10		8.17	4.31	1.73; 1.42	2.14	
Thr <sup>7</sup>	7.81	4.22	4.01	1.02		7.78	4.22	4.01	1.02		7.87	4.20	4.01	1.02		7.78	4.22	4.09; 4.03	1.02	
Gln <sup>8</sup>	7.87	4.38	1.87; 1.72	2.10		7.87	4.375	1.84; 1.78	2.10		7.87	4.38	1.84; 1.72	2.10		7.86	4.37	1.88; 1.70	2.11	
Thr <sup>9</sup>	8.05	4.37	3.84	1.13		8.08	4.36	3.83	1.13		8.04	4.37	3.84	1.12		8.03	4.36	3.83	1.13	
Pro <sup>10</sup>	–	4.37	2.03	1.92; 1.84	3.72; 3.62	–	4.37	2.03	1.90; 1.84	3.72; 3.64	–	4.37	2.03; 1.85	1.93; 1.84	3.72; 3.64	–	4.37	2.02	1.90; 1.84	3.77; 3.62
Lys <sup>11</sup>	8.06	4.32	1.70; 1.54	1.36	1.52	8.05	4.32	1.71; 1.54	1.36	1.52	8.07	4.32	1.70; 1.51	1.36	1.52	8.06	4.32	1.70	1.36	1.52
Thr <sup>12</sup>	7.65	4.18	4.14	1.04		7.65	4.18	4.14	1.04		7.65	4.18	4.14	1.04		7.65	4.18	4.14	1.04	

2% DBU/2% 4-MePip/DMF происходит  $\alpha \rightarrow \beta$ -перегруппировка амидной связи в последовательности Asp<sup>4</sup>-Lys<sup>5</sup> с образованием циклического аспартимида (III).

Таким образом, были идентифицированы наиболее существенные примеси, образующиеся при ТФС инграмона с использованием Fmoc-методологии, и их структура была подтверждена независимыми физико-химическими методами и встречным синтезом. Следующей задачей была оптимизация методики получения инграмона.

#### Оптимизация методики синтеза инграмона

Для разработки оптимальной методики было изучено влияние различных факторов на состав неочищенного продукта ТФС. Нами был получен октапептидилполимер H-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Thr(Bu<sup>t</sup>)-Gln(Trt)-Thr(Bu<sup>t</sup>)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu<sup>t</sup>)-полимер (V), образец которого был полностью деблокирован для оценки его чистоты с помощью ВЭЖХ. Содержание основного вещества в этом продукте составляло не менее 90%. В дальнейшем аликваты октапептидилполимера (V) были использованы в качестве исходных соединений в серии тестовых синтезов инграмона, в которых меняли реагенты для отщепления Fmoc-группы и способ создания амидной связи.

Из литературы известны различные методические приемы подавления транспептидации: используют объемные, стерически затрудненные защитные группы для  $\beta$ -карбоксильной функции аспарагиновой кислоты; полимерные носители со стерически затрудненными якорными группами; модифицированные реагенты для отщепления Fmoc-защит, сокращают суммарное время воздействия основных реагентов [12, 14]. В первую очередь было изучено влияние состава деблокирующего реагента на качество неочищенного продукта ТФС, результаты этих опытов приведены в табл. 3.

Представленные в табл. 3 данные показывают, что использование сильного основания – DBU – в составе смеси для отщепления Fmoc-защит приводит к образованию более 20% побочного аспартимида, отсутствие DBU в деблокирующем реагенте практически на порядок снижает содержание аспартимида (до 2.67%), а добавка 1-гидроксибензотриазола к 25% раствору 4-метилпиперидина [14] в DMF минимизирует протекание этого побочного процесса (содержание аспартимида (III) в этом случае колеблется от 0.6 до 0.9%). Вариация суммарного времени деблокирования в пределах 40–60 мин в наших экспериментах не отражалось на результатах синтеза.

В серии экспериментов, проводившихся с использованием оптимального деблокирующего реагента, было изучено влияние способа создания

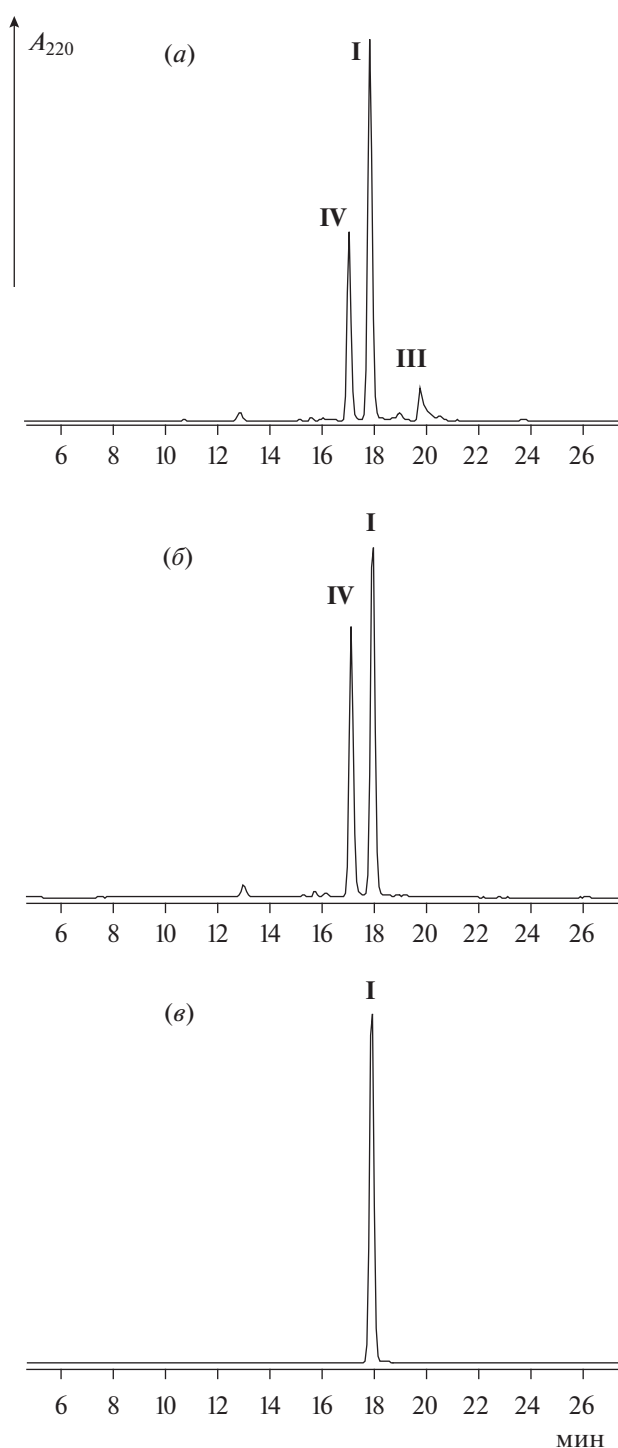


Рис. 2. Аналитическая ВЭЖХ (условия 2, см. эксперимент. ч.): а – продуктов щелочного гидролиза [Asi<sup>4</sup>инграмона (1% NH<sub>4</sub>OH, pH 9.0, 16 ч); б – искусственной смеси образцов инграмона (I) и [βAsp<sup>4</sup>]инграмона (IV); в – пептид (I), очищенный с помощью препаративной ВЭЖХ (см. эксперимент. часть).

амидных связей и используемого полимерного носителя на качество неочищенного инграмона. Результаты этих опытов приведены в табл. 4 и 5.

Из данных, представленных в табл. 4, следует, что при ступенчатом наращивании пептидной це-

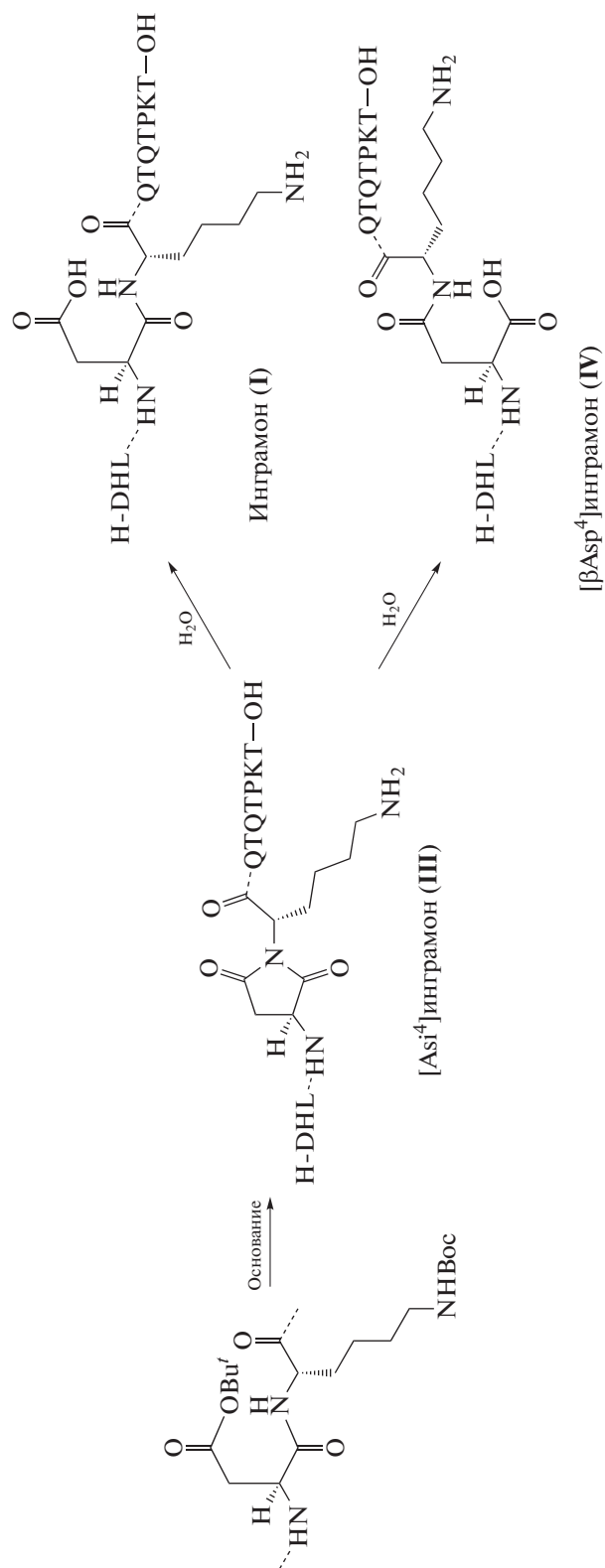


Рис. 3. α → β-Перегруппировка амидной связи, образуемой карбоксильной группой остатка Asp<sup>4</sup> в последовательности инграмона H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Thr-Lys-Thr-OH.

Таблица 2. Характеристики пептидов

Пептид	Последовательность (Мол. масса)	Чистота по ВЭЖХ, %	ВЭЖХ*, R <sub>t</sub> (мин)		МС (MALDI), m/z
			pH 3.0	pH 5.95	
(I)	H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH Инграмон (M 1411.52)	99	16.82	17.90	1411.826 [M + H] <sup>+</sup> 1433.858 [M + Na] <sup>+</sup> 1449.854 [M + K] <sup>+</sup>
(II)	H-Asp-His-Leu- <b>D-Asp</b> -Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH [D-Asp <sup>4</sup> ]Инграмон (M 1411.52)	95	17.35	17.90	1411.787 [M + H] <sup>+</sup> 1433.814 [M + Na] <sup>+</sup> 1449.807 [M + K] <sup>+</sup>
(III)	H-Asp-His-Leu-Asi-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH [Asi <sup>4</sup> ]Инграмон (M 1393.52)	95	18.04	19.72	1393.371 [M + H] <sup>+</sup> 1455.334 [M + Na + K] <sup>+</sup>
(IV)	H-Asp-His-Leu-Asp(Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH)-OH [βAsp <sup>4</sup> ]Инграмон (M 1411.52)	96	16.82	17.07	1411.845 [M + H] <sup>+</sup> 1433.808 [M + Na] <sup>+</sup> 1449.800 [M + K] <sup>+</sup>

ВЭЖХ\*: колонка Kromasil 100-5-C18 (4.6 × 250 мм). Подвижная фаза: буфер А – 0.05 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, буфер Б – 70% ацетонитрил, градиент Б в А от 0 до 40% за 40 мин, скорость потока – 1 мл/мин. Детекция пептидов при длине волны 220 нм. Модификации пептидной цепи выделены жирным шрифтом.

Таблица 3. Влияние реагента для отщепления Fmoc-защит на состав неочищенного продукта ТФС инграмона на полимере Ванга

Деблокирующий реагент	Время деблокирования, мин (Σ*, мин)	Конденсирующий реагент	Содержание инграмона (I) в неочищенном продукте по ВЭЖХ**, %	Содержание примесей по ВЭЖХ, %	
				[D-Asp <sup>4</sup> ]инграмон (II)	[Asi <sup>4</sup> ]инграмон (III)
2% 4-MePip/2% DBU/DMF	10 (40)	TBTU/NMM	46.80	5.90	21.70
25% 4-MePip/DMF	15 (60)	DCC/NOBt	77.78	0.68	2.67
25% 4-MePip/DMF/0.1 М NOBt	15 (60)	DCC/NOBt	84.20	0.52	0.60

\* В скобках приведено суммарное время (в ходе 4-х циклов) обработки аспартил-полимера основным деблокирующим реагентом.

\*\* Приведены данные ВЭЖХ на колонке (4.6 × 250 мм) Kromasil 100-5-C18 в условиях 1.

пи лучшие результаты получаются при использовании карбодиимидного метода, применение солей урония в реакциях пептидообразования дает более высокий выход диастереомерного продукта –

[D-Asp<sup>4</sup>]инграмона (II). Однако при 20-кратном увеличении масштаба синтеза даже при использовании смеси DCC/NOBt содержание примеси диастереомерного пептида (II) растет. Видимо,

Таблица 4. Влияние способа создания амидной связи на состав неочищенного продукта ТФС инграмона при использовании 25% 4-MePip/DMF/0.1 М NOBt для отщепления Fmoc-защит

Масштаб ТФС, ммоль стартовой аминокислоты	Конденсирующий агент	Содержание инграмона (I) в неочищенном продукте по ВЭЖХ, %	Содержание примесей по ВЭЖХ, %	
			[D-Asp <sup>4</sup> ]инграмон (II)	[Asi <sup>4</sup> ]инграмон (III)
0.5	TBTU/NMM	74.5	0.89	0.72
0.5	DIC/NOBt	84.2	0.52	0.60
9.0	DIC/NOBt	83.7	1.16	0.87

**Таблица 5.** Влияние природы полимерного носителя на состав неочищенного продукта ТФС инграмона в масштабе 0.5 ммоль при использовании смеси 25% 4-MePip/DMF/0.1 M HOBT для отщепления Fmoc-защит и DIC/HOBT-метода для создания амидных связей

Полимерный носитель	Содержание стартовой аминокислоты, моль/г	Содержание инграмона (I) в неочищенном продукте по ВЭЖХ, %	Содержание примесей по ВЭЖХ, %		Выход*, %
			[D-Asp <sup>4</sup> ]инграмон (II)	[Asi <sup>4</sup> ]инграмон (III)	
Полимер Ванга	0.50	84.20	0.52	0.60	48.7
2-СТС-полимер	0.46	85.51	0.30	0.32	54.2

\* Выходы приведены в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру.

это связано с увеличением времени, необходимо для проведения отдельных процедур ТФС при увеличении масштаба синтеза.

Данные, приведенные в табл. 5, показывают, что при использовании оптимальных деблокирующего и конденсирующего реагентов результаты ТФС инграмона на стандартном полимере Ванга с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой и полимере с объемной 2-хлортритилхлоридной (2-СТС) якорной группой сравнимы с точки зрения содержания целевого пептида (I), однако содержание примесей (II) и (III) в последнем случае почти вдвое меньше. Выход пептида (I) при синтезе на 2-СТС-полимере также несколько выше – 54.2%. При тест-синтезе на полимере Ванга выход пептида (I) составлял 48.7%. Этот результат согласуется с литературными данными [12] о том, что в некоторых синтезах использование 2-СТС-полимера обеспечивало снижение образования побочного аспартимида.

В результате проведенных исследований

- разработана методика ТФС инграмона, согласно которой использование модифицированного реагента для отщепления Fmoc-защит (раствора 25% 4-MePip/DMF с добавкой 0.1 M HOBT), карбодиимидного способа создания пептидных связей (DIC/HOBT) и полимерного носителя с 2-хлортритилхлоридной якорной группой обеспечивают получение целевого пептида с хорошей чистотой и низким содержанием побочных продуктов транспептидации и рацемизации по остатку Asp<sup>4</sup> (рис. 1г и 2е);

- идентифицированы примеси родственных инграмону пептидов, образование которых возможно в процессе его ТФС;

- разработана методика контроля качества продуктов ТФС инграмона, предполагающая обязательное использование при его ВЭЖХ буферов с различными значениями pH.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные аминокислот (Novabiochem, ФРГ), DMF, NMM, HOBT, TBUTU, TIS, дихлорметан и трифторуксусную кис-

лоту (Fluka, Швейцария). Для ВЭЖХ применяли ацетонитрил фирмы “Carl Roth GmbH” (ФРГ).

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Knauer (ФРГ) на колонке (4.6 × 250 мм) Kromasil 100-5 C18 (Швеция), размер частиц сорбента 5 мкм, размер пор порядка 100Å. В качестве элюентов использовали: буфер А – 0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3.0 (условия 1) или 0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5.95 (условия 2); в условиях 1 и 2 буфер Б – 70% ацетонитрил в буфере А, элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин в градиенте концентрации буфера Б в буфере А от 0 до 40% за 40 мин. Детекция – при длине волны 220 нм. Препаративную ВЭЖХ пептидов (II)–(IV) осуществляли на колонке Kromasil 100-10-C18 (30 × 250 мм) с размером частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А – 0.1% водный раствор TFA, содержащий 3% ацетонитрила, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Элюцию проводили от 100% буфера А в градиенте концентрации 0.5%/мин буфера Б со скоростью 20 мл/мин. ВЭЖХ пептида (I) выполняли на колонках Kromasil 100-10-C18 (30 × 250 мм) или (50 × 250 мм) с размером частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А – 0.01 M водный раствор ацетата аммония с pH 4.5, содержащий 3% ацетонитрила, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Элюцию проводили от 100% буфера А в градиенте концентрации 0.5% мин буфера Б со скоростью 50 мл/мин. Пептиды детектировали при длине волны 220 нм. Фракции, соответствующие целевому веществу, объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизовали.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц (ФРГ) в DMSO-d<sub>6</sub> при 300 K, концентрация пептидов составляла 2–3 мг/мл, химические сдвиги (δ, м.д.) измеряли относительно тетраметилсилана. Отнесение сигналов к определенным группам протонов аминокислотных остатков проводили с помощью метода дифференциального двойного резонанса. Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Bruker Autoflex speed (Bruker Daltonics Inc., ФРГ), оснащенном твердотельным УФ-лазером с λ 355 нм и рефлектроном, в режиме регистрации положи-



тельно заряженных ионов. Для регистрации масс-спектров MALDI использовали стальную мишень MTP 384 ground steel. Частота облучения 50 Гц, при регистрации масс-спектра суммировались данные, полученные при 10 последовательных облучениях.

#### *Твердофазный синтез пептидов*

Автоматический синтез пептидов **H-Asp-His-Leu-D-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH (II)** и **H-Asp-His-Leu-Asp(Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH)-OH (IV)** проводили на синтезаторе Tribute-UV (Protein Technologies, Inc., США) в масштабе 0.5 ммоль в соответствии с программой однократной конденсации Fmoc-аминокислот. Пептидную цепь наращивали с C-конца по одной аминокислоте, исходя из Fmoc-Thr(Bu<sup>t</sup>)-полимера Ванга (Novabiochem, ФРГ), содержащего 0.50 ммоль/г стартовой аминокислоты. Цикл ТФС включал следующие стадии: 1) промывки DMF Fmoc-аминоацил- или пептидилполимера; 2) деблокирование  $\alpha$ -аминогрупп 25% 4-MePip/DMF/0.1 М HOBT (2  $\times$  5 мин), 3) конденсация 0.4 М раствора 4-кратного избытка ацилирующего агента (2.0 ммоль Fmoc-аминокислоты + 2.0 ммоль HOBT + 2.0 ммоль DIC) в DMF в течение 1 ч; 4) промывки DMF. Пептиды отщепляли от полимерного носителя действием смеси TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (90 : 5 : 5 v/v) в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Полимер отфильтровывали, промывали на фильтре деблокирующей смесью, фильтрат упаривали, продукт осаждали сухим диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром, DCM, эфиром и высушивали. Пептиды очищали с помощью ВЭЖХ, как описано выше. Выходы пептидов (II) и (IV) составили 48.2 и 45.0% соответственно, в расчете на стартовую аминокислоту. Их характеристики приведены в табл. 1 и 2.

#### **H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH (I)**

##### *ТФС на полимере Ванга*

Синтез пептида (I) проводили в ручном режиме, исходя из 22 г (11.0 ммоль) Fmoc-Thr(Bu<sup>t</sup>)-полимера Ванга (содержание стартовой аминокислоты – 0.5 ммоль/г).

**Получение октапептидилполимера Fmoc-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Thr(Bu<sup>t</sup>)-Gln(Trt)-Thr(Bu<sup>t</sup>)-Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu<sup>t</sup>)-полимера (V).** Цикл ТФС включал следующие стадии: 1) промывки Fmoc-аминоацил-/пептидилполимера DMF; 2) деблокирование  $\alpha$ -аминогрупп 25% 4-MePip/DMF (5 + 10 мин), 3) конденсация с 0.4 М раствором 4-кратного избытка ацилирующего агента (44.0 ммоль Fmoc-аминокислоты + 44.0 ммоль HOBT + 44.0 ммоль DIC) в DMF в течение 1.5 ч; 4) промывки DMF, 5) тест с

нингидрином на остаточные аминокислоты [15]. Для оценки качества промежуточного октапептида образец N <sup>$\alpha$</sup>  –свободного пептидил-полимера (V) был обработан деблокирующей смесью TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (90 : 5 : 5 v/v) в течение 1 ч и после осаждения диэтиловым эфиром продукт анализировали ВЭЖХ в условиях 1. Содержание основного вещества в образце составило 91%. Аликвоты пептидилполимера (V), содержание пептида в которых составляло  $\approx$ 0.5 ммоль, использовали для тест-синтезов инграмона (I), условия и результаты которых представлены в табл. 3–5. Основную часть октапептидилполимера (V) с содержанием пептида  $\approx$ 9.0 ммоль использовали для получения целевого продукта (I). Цикл ТФС включал следующие стадии: 1) промывки Fmoc-аминоацил-/пептидилполимера DMF; 2) деблокирование  $\alpha$ -аминогрупп 25% 4-MePip/DMF/0.1 М HOBT (5 + 10 мин), 3) конденсация 0.4 М раствора 4-кратного избытка ацилирующего агента (36.0 ммоль Fmoc-аминокислоты + 36.0 ммоль HOBT + 36.0 ммоль DIC) в DMF в течение 1.5 ч; 4) промывки DMF, 5) тест с нингидрином на остаточные аминокислоты. После заключительного отщепления Fmoc-группы и промывок пептидилполимер высушивали и деблокировали действием 350 мл смеси TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (90 : 5 : 5 v/v) в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Полимер отфильтровывали, промывали на фильтре деблокирующей смесью, фильтрат упаривали, продукт осаждали сухим диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром, DCM, эфиром и высушивали. Пептид (I) очищали с помощью ВЭЖХ, как описано выше.

Получено 7.2 г инграмона-ацетата (выход 46.6% в расчете на стартовую аминокислоту), содержание уксусной кислоты, определенное ВЭЖХ, составило 4.0%, содержание воды, определенное методом К. Фишера, – 4.7%. Масс-спектр: найдено  $m/z$  1411.8, вычислено для C<sub>59</sub>H<sub>98</sub>N<sub>18</sub>O<sub>22</sub> M – 1411.52. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР см. табл. 1.

##### *ТФС на 2-СТС-полимере*

Автоматический синтез пептида (I) проводили на синтезаторе Tribute-UV с использованием полимерного носителя (Iris Biotech, ФРГ) с 2-хлортритилхлоридной (2-СТС) якорной группой, содержащего 1.2 экв. Cl/г 2-СТС-полимера. Для присоединения стартовой аминокислоты [16] к 1.5 г (1.8 ммоль) 2-СТС-полимера прибавляли раствор 1.43 г (3.6 ммоль) Fmoc-Thr(Bu<sup>t</sup>)-OH в 15 мл DCM, в полученную суспензию приливали 1.53 мл (9.0 ммоль) DIEA и перемешивали 30 мин при 25°C, полимер отфильтровывали и промывали DCM 2  $\times$  15 мл, DMF 2  $\times$  15 мл, DCM 2  $\times$  15 мл. Для отщепления остаточного хлора аминоацилполимер обрабатывали 15 мл смеси DCM–MeOH–DIEA

(80 : 15 : 5 v/v) 2 × 10 мин, промывали DCM 4 × 15 мл, высушивали и сразу использовали. Содержание стартовой аминокислоты, определенное спектрофотометрически, составило 0,46 ммоль Fmoc-Thr(Bu<sup>t</sup>)/г аминокислоты полимера. ТФС пептида (I) проводили, исходя из 1,1 г (0,5 ммоль) аминокислоты полимера. Цикл ТФС включал те же стадии, что и при получении пептидов (II) и (IV): 1) промывки Fmoc-аминоацил- или пептидилполимера DMF; 2) деблокирование α-аминогрупп 25% 4-MePip/DMF/0,1 M HOBT (2 × 5 мин), 3) конденсация 0,4 M раствора 4-кратного избытка ацилирующего агента (2,0 ммоль Fmoc-аминокислоты + 2,0 ммоль HOBT + 2,0 ммоль DIC) в DMF в течение 1 ч; 4) промывки DMF. Пептид отщепляли от полимерного носителя действием смеси TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (90 : 5 : 5 v/v) в течение 1,5 ч при комнатной температуре и очищали с помощью ВЭЖХ, как описано выше. Выход пептида (I) составил 54,2% в расчете на стартовую аминокислоту. Масс-спектр: найдено *m/z* 1411,9, вычислено для C<sub>59</sub>H<sub>98</sub>N<sub>18</sub>O<sub>22</sub> M – 1411,52. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР см. табл. 1.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день доказана способность инграмона подавлять миграцию моноцитов и оказывать противовоспалительное действие как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях (у здоровых добровольцев и больных с ишемической болезнью сердца). Возможность использования этого пептида для терапии сердечно-сосудистых заболеваний диктует необходимость разработки оптимизированных способов его синтеза. Оптимальная методика синтеза инграмона, позволяющая получать этот пептид с низким содержанием родственных примесей, предполагает использование для отщепления Fmoc-защит раствора 25% 4-MePip/DMF с добавкой 0,1 M HOBT, карбодиимидного способа создания пептидных связей и полимерного носителя с 2-хлортритилхлоридной якорной группой. Разработанная методика воспроизводится при масштабировании синтеза инграмона. Эти результаты являются принципиально важными для организации в ФГБУ “НМИЦ кардиологии” Минздрава России экспериментального производства инграмона и его запланированных клинических испытаний.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения России (рег. № НИОКТР АААА-А19-119022290045-1).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чазов Е.И., Сидорова М.В., Молокоедов А.С. Арефьева Т.И., Кухтина Н.Б., Красникова Т.Л., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н. Пептид, обладающий способностью ингибировать миграцию моноцитарных клеток, стимулированную белком MCP-1. Патент РФ № 2260598. Заявл. 29.10.2003. Опубл. 20.09.2005. Бюл. № 26.
2. Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Арефьева Т.И., Кухтина Н.Б., Красникова Т.Л., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н. // Биоорганич. химия. 2004. Т. 30. С. 582–593. [Sidorova M.V., Molokoevov A.S., Aref'eva T.I., Kukhtina N.B., Krasnikova T.L., Beshpalova Zh.D., Bushuev V.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 523–533.]
3. Красникова Т.Л., Арефьева Т.И., Мелехов М.Г., Кухтина Н.Б., Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Бушуев В.Н., Беспалова Ж.Д., Чазов Е.И. // ДАН. 2005. Т. 404. С. 551–554.
4. Чазов Е.И., Красникова Т.Л., Беспалова Ж.Д., Кухтина Н.Б., Мелехов М.Г., Арефьева Т.И., Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Гвоздик Т.Е., Мартыанов Б.М., Поздеев В.В., Сергиенко В.Б., Бушуева Т.Л. // ДАН. 2006. Т. 411. С. 270–272.
5. Chazov E.I., Beshpalova J.D., Aref'eva T.I., Kukhtina N.B., Sidorova M.V., Provatorov S.I., Krasnikova T.L. // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2007. V. 85. P. 332–340.
6. Кухтина Н.Б., Баштрыков П.П., Беспалова Ж.Д., Сидорова М.В., Арефьева Т.И., Соколов В.О., Красникова Т.Л. // Рос. физиолог. журн. им. И.М. Сеченова. 2008. Т.94. С. 27–37. [Kukhtina N.B., Bashtrykov P.P., Beshpalova Zh. D., Sidorova M.V., Aref'eva T.I., Sokolov V.O., Krasnikova T.L. // Neurosci. and Behav. Physi. 2009. V. 39. P. 153–159.]
7. Красникова Т.Л., Никитин П.И., Ксеневиц Т.И., Горшков Б.Г., Орлов А.В., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Арефьева Т.И., Мамочкина Е.Н., Ефремов Е.Е., Беспалова Ж.Д. // ДАН. 2010. Т. 433. С. 559–562.
8. Aref'eva T.I., Krasnikova T.L., Potekhina A.V., Ruleva N.U., Nikitin P.I., Ksenovich T.I., Gorshkov B.G., Sidorova M.V., Beshpalova Zh. D., Kukhtina N. B., Provatorov S.I., Noyeva E.A., Chazov E.I. // Inflamm. Res. 2011. V. 60. P. 955–964.
9. Потехина А.В., Проваторов С.И., Арефьева Т.И., Кухтина Н.Б., Масенко В.П., Казначеева Е.И., Рулева Н.Ю., Ноева Е.А., Осяева М.К., Сидорова М.В., Беспалова Ж.Д., Красникова Т.Л. // Терапевтический архив. 2010. Т. 82. С. 58–63.
10. Lauer J.L. Fields C.G., Fields G.B. // Lett. Peptide Sci. 1994. V. 1. P. 197–205.
11. Stathopoulos P., Papas S., Kostidis S., Tsikaris V. // J. Peptide Sci. 2005. V. 11. P. 658–664.
12. Subirós-Funosas R., El-Faham A., Albericio F. // Tetrahedron. 2011. V. 67. P. 8585–8593.
13. Tickler A.K., Barrow C.J., Wade J.D. // J. Peptide Science. 2001. V. 7. P. 488–494.

14. *Michels T., Dölling R., Haberkorn U., Mier W.* // *Org. Lett.* 2012. V. 14(20). P. 5218–5221.
15. *Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I.* // *Anal. Biochem.* 1970. V. 34. P. 595–598.
16. *Barlos K., Gatos D.* // *Convergent peptide synthesis // Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach / Eds. Chan W.C., White P.D.* Oxford Univ. Press, 2001. P. 215–228.

## Optimization of the Solid Phase Synthesis of Ingramon – Peptide Antagonist of the Human Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)

**M. V. Sidorova\*.,#, U. S. Dudkina\*, D. V. Avdeev\*,  
M. E. Palkeeva\*, A. S. Molokoedov\*, M. V. Ovchinnikov\*, A. A. Azmuko\*,  
S. B. Grechishnikov\*, E. V. Kudryavtseva\*, V. N. Bushuev\*, and T. I. Arefieva\***

*#Phone: + 7 (495) 414-67-16; fax: +7 (495) 414-67-86; e-mail: peptide-cardio@yandex.ru*

*\*National Cardiology Research Center, Tret'ya Cherepkovskaya ul., 15A, Moscow, 121552 Russia*

*\*\*“Peptide Synthesis Ltd.”, Tret'ya Cherepkovskaya ul., 15A, Moscow, 121552 Russia*

The method of solid-phase synthesis (SPS) of an Ingramon – H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH – peptide antagonist of human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) with anti-inflammatory effect was optimized. By-products of Fmoc – SPS were studied, their structure was established by  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy and mass spectrometry and confirmed by counter synthesis. Methodic skills allowing to minimize the formation of impurities during SPS of Ingramon were proposed. A reproducible technique for producing Ingramon has been developed to minimize the formation of by-products corresponding to [Asi<sup>4</sup>]-, [D-Asp<sup>4</sup>]- and [ $\beta$ -Asp<sup>4</sup>]-peptides during its solid-phase synthesis.

*Keywords: human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), Ingramon, solid phase peptide synthesis, aspartimide formation,  $^1\text{H NMR}$  spectroscopy*