



УДК 547.964.4.057:577.112.6.(017+088.53)

ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕЗА [MeArg¹, Nle¹⁰]АПЕЛИНА-12 И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СТАБИЛЬНОСТИ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПРОТОННОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

© 2019 г. М. В. Сидорова*, #, М. Е. Палькеева*, А. А. Азьмуко*, М. В. Овчинников*,
А. С. Молокоедов*, В. Н. Бушуев*, О. И. Писаренко*

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

Поступила в редакцию 19.03.2018 г.

После доработки 10.04.2018 г.

Принята к публикации 09.06.2018 г.

Разработан способ твердофазного синтеза MeArg¹, Nle¹⁰-аналога апелина-12 (метилина) с использованием Fmoc-методологии в сочетании с временной защитой гуанидиновой функции остатков аргинина протонированием (солеобразованием) на стадии образования амидной связи. С помощью спектроскопии протонного магнитного резонанса проведена сравнительная оценка протеолитической стабильности апелина-12 и его структурного аналога в плазме крови человека; показано, что время полураспада аналога в плазме примерно в три раза больше, чем у природного пептида.

Ключевые слова: апелин-12, MeArg¹, Nle¹⁰-аналог, твердофазный синтез, протеолитическая стабильность, спектроскопия ЯМР

DOI: 10.1134/S0132342319010159

ВВЕДЕНИЕ

Разработка подходов к снижению повреждения сердца, вызванного ишемическим и реперфузионным стрессом, является актуальной задачей экспериментальной кардиологии. В последние годы в различных лабораториях осуществляется направленный поиск новых соединений, способных воздействовать на адаптационные механизмы в миокардиальных клетках в условиях изменившегося кислородного и энергетического обеспечения и таким образом уменьшать повреждение

сердца. При ишемии и последующей реперфузии в миокарде увеличивается выработка ряда присутствующих организму факторов – адипокинов, цитокинов и вазоактивных пептидов, инициирующих механизмы запрограммированного клеточного выживания, которые запускаются каскадами реперфузионных киназ. К таким соединениям относится адипокин апелин, являющийся лигандом сопряженного с G-белками APJ-рецептора и представляющий собой 77-членный полипептид.

Апелин активно экспрессируется различными тканями, включая эндотелиальные и гладкомышечные клетки коронарных сосудов и кардиомиоциты. Активация системы апелин/APJ-рецептор оказывает вазодилатирующее действие на сосуды, стимулирует транспорт ионов Ca²⁺ в кардиомиоциты, улучшая сократимость миокарда, снижает толерантность к инсулину при ожирении, препятствует образованию атеросклеротических бляшек [1]. Показано, что C-концевые фрагменты апелина (апелин-36, апелин-17, апелин-13 и апелин-12) способны улучшать восстановление функции сердца и снижать необратимые повреждение кардиомиоцитов при реперфузии после длительной ишемии [2]. Пептид апелин-12 (H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-OH, A12), соответствующий C-концевому фрагменту апелина у животных различных видов и человека, является минимальной активной частью молекулы исходного апелина-

Сокращения: Вос – трет-бутилоксикарбонил; BOP – бензотриазол-1-илокси-трис(триметиламино)фосфония гексафторфосфат; Bu^t – трет-бутил; DBU – (1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен; DCM – дихлорметан; DIC – N,N'-диизопропилкарбодимид; DMF – диметилформамид; DMSO – диметилсульфоксид; DTT – дитиотреитол; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; HOBT – 1-гидроксибензотриазол; MALDI – матрично активированная десорбция/ионизация; MeArg – N^ω-метиларгинин; MS – масс-спектрометрия; Mtg – 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил; MePip – 4-метилпиперидин; NMP – N-метилпирролидон; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; Pmc – 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил; Prg – пироглутаминовая кислота; TBTU – N,N,N',N'-тетраметил-O-(бензотриазол-1-ил)уруния тетрафторборат; THF – тетрагидрофуран; TIBS – триизобутилсилан; 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).

77. Он обладает высоким сродством к ARJ-рецептору и оказывает мощное защитное действие при экспериментальной ишемии и реперфузии сердца у крыс [3, 4].

Эти данные указывают на возможность использования пептидов в качестве потенциальных кардиопротекторных лекарственных средств, однако чувствительность пептидов к протеолитической деградации в организме человека является серьезным препятствием к их практическому применению. Во многих лабораториях ведется поиск модифицированных аспиноновых пептидов, обладающих селективным действием и метаболической устойчивостью [5, 6].

Нами ранее были синтезированы оригинальные пептиды на основе природного аспина-12 [7, 8]. С целью увеличения протеолитической стабильности в структуры этих соединений были внесены следующие модификации: *N*-концевой остаток аргинина был защищен от действия аминопептидаз N^{α} -метильной группой; подверженный окислению остаток метионина был заменен на норлейцин; *C*-концевой остаток фенилаланина защищали от действия карбоксипептидаз амидированием. Полученные аналоги обладали кардиопротекторной активностью при моделировании ИБС и хронической сердечной недостаточности на лабораторных животных. Было выяснено, что наибольшей защитной эффективностью обладает пептид химической структуры *N*-MeArg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH, названный метилином. Преимуществом метилина по сравнению с природными кардиопротекторами является комбинированный характер его действия, который включает метаболическую коррекцию, антиоксидантную защиту и стабилизацию мембран кардиомиоцитов, поддержку внутриклеточного ионного гомеостаза и вазодилатационные свойства [9, 10]. Антиишемические и инотропные (увеличение силы сердечных сокращений) свойства этого пептида могут найти клиническое применение в кардиологической практике.

Данная работа является продолжением наших исследований в области дизайна, синтеза и изучения пептидных кардиопротекторов и посвящена разработке оптимизированной методики синтеза и оценке протеолитической стабильности наиболее перспективного в плане практического применения MeArg¹, Nle¹⁰-аналога аспина-12 — метилина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация схемы синтеза метилина. При твердофазном синтезе (ТФС) пептидов, содержащих в последовательности несколько остатков аргинина, часто возникают проблемы, связанные с защитами гуанидиновой функции этой аμιно-

кислоты. Как правило, в ТФС в сочетании с N^{α} -Fmoc-защитой для блокирования гуанидиновой функции аргинина применяют группы тозилитического типа (Mtr, Pmc или Pbf). При отщеплении Mtr-или Pmc-защит требуются достаточно жесткие условия и длительные обработки, часто сопровождающиеся образованием побочных продуктов например, реакция сульфатирования гидроксильных групп остатков серина и/или треонина (с выходом побочного продукта до 50%) [11]. Эта побочная реакция характерна и при синтезе аспиноновых пептидов.

Ранее мы показали [8], что при получении аспина-12 содержание побочного *O*-сульфата в “сыром” продукте ТФС может колебаться от 6 до 48% в зависимости от состава смеси, использованной для заключительного деблокирования и отщепления пептида от полимерного носителя. При синтезе метилина мы также столкнулись с образованием соответствующего побочного продукта — *O*-сульфата метилина. Было установлено, что степень сульфатирования остатка Ser снижается в присутствии воды как скэвенджера в составе деблокирующей смеси, однако полностью подавить эту реакцию не удастся. При ТФС аспиноновых пептидов в граммовых количествах данная проблема встает более остро, поскольку при укрупнении масштаба синтеза, как правило, повышается интенсивность побочных процессов и, как следствие этого, усложняется очистка пептидов.

С целью исключения возможности образования трудноотделимых побочных продуктов, описанных выше, мы предприняли попытку ТФС метилина с использованием введения остатка аргинина с незащищенной гуанидиновой функцией, хотя примеры реализации такого подхода в твердофазном синтезе пептидов немногочисленны. Принципиальная возможность использования в синтезе производных N^G -незамещенного аргинина обусловлена тем, что основность гуанидиновой функции ($pK_a \approx 12.5$) намного выше основности α -аминогруппы эфиров аминокислот; эта разница в основности позволяет в ходе пептидного синтеза селективно блокировать гуанидиновую группу протонированием, что и обеспечивает ее временную защиту на стадии создания амидной связи [12]. Сообщалось об успешном ТФС аналогов рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LH-RH) с применением тактики минимальной защиты, когда аргинин защищали солеобразованием [13].

В нашей лаборатории с применением этой тактики были осуществлены успешные синтезы брадикинина и октапептидного фрагмента 584–591 гликопротеина gp41 ВИЧ1 ступенчатым наращиванием пептидной цепи [14], β -амилоида-(1–42) [15] фрагментной конденсацией на твердой фазе с использованием аргинина без защиты гуаниди-

новой функции. Для протонирования гуанидиновой группы аргинина использовали хлоргидрат [13] или бромгидрат пиридина [14, 15]; для присоединения соответствующих производных Boc или Fmoc-Arg(H⁺)-OH применяли карбодиимидный метод [13–15] или регент Кастро – ВОР [14]. В работе [14] было показано, что конденсация N^α-Fmoc-аргинина с пептидилполимерами в присутствии *N,N*-диизопропилкарбодиимида или ВОР не сопровождается рацемизацией.

Синтез метилина проводили с C-конца с применением Fmoc-методологии. Для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот использовали следующие защиты: Bu^t –

для гидроксильной функции серина, Trt – для имидазольной функции гистидина и Boc – для ε-аминогруппы лизина, гуанидиновые группы аргининов не защищали. Для исключения из синтетического цикла проблемной стадии пролинсодержащего дипептидилполимера (H-Pro-Phe-P), на первом этапе ТФС фенилаланил-полимер конденсировали с дипептидным блоком Fmoc-Nle-Pro-OH, далее пептидную цепь наращивали по одной аминокислоте. Для присоединения *N*-концевого остатка аргинина использовали его N^αBoc, N^α-метильное производное (Boc-MeArg), остаток аргинина в третьем положении пептида вводили в виде Fmoc-производного.

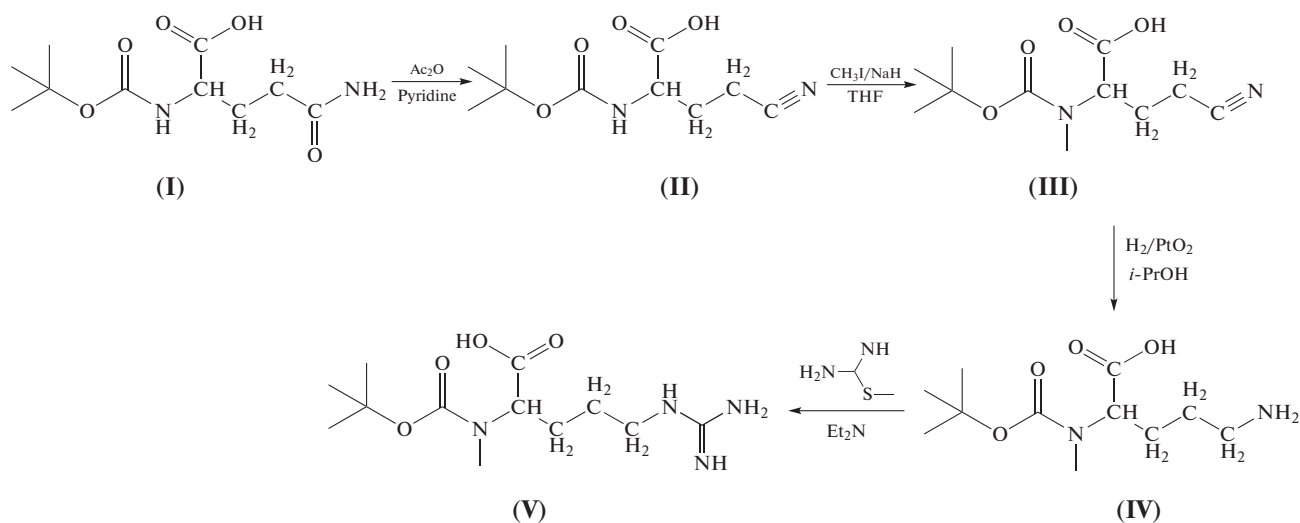


Схема 1. Получение Boc-MeArg-OH.

Синтез Boc-MeArg-OH осуществляли, опираясь на описанную методику [16], по схеме 1, исходя из Boc-*L*-глутамина (I). На первой стадии под действием уксусного ангидрида в пиридине происходит дегидратация γ-карбоксамидной функции Boc-глутамина с образованием соответствующего нитрила (II). Затем проводили селективное метилирование α-аминогруппы соединения (II) с использованием иодистого метила и гидрида натрия в тетрагидрофуране с образованием кристаллической *N*-Boc-2-метиламино-4-циано-*L*-масляной кислоты (III). Гидрогенолизом продукта (III) на платиновом катализаторе в изопропиловом спирте получали N^αBoc, N^αMe-орнитин (IV), в который вводили гуанидиновую группу действием *S*-метилизотиомочевины в присутствии триэтиламина с образованием целевого N^αBoc, N^αMe-аргинина (V). Соединение (V) очищали на катионообменнике в пиридин-ацетатном буфере до 95%-й чистоты. Полученный продукт был идентичен коммерческому образцу. Структуру полупродуктов и целевого соединения (V) подтверждали данными спектроскопии ¹H-ЯМР, а

их чистоту анализировали с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе.

Для разработки оптимальной схемы синтеза были проведены тестовые ТФС метилина в автоматическом и ручном режиме, в которых меняли масштаб синтеза (от 0.5 до 1.5 ммоль), реагенты для протонирования гуанидиновой функции аргинина и способ создания амидной связи. Для протонирования гуанидиновой группы применяли либо бромгидрат пиридина [14, 15], либо 1-гидроксибензотриазол (НОВТ). При этом оказалось, что НОВТ эффективно блокирует боковую функцию аргинина, а получаемые при этом соли N^α-защищенного аргинина существенно лучше, чем соответствующие хлор- или бромгидраты, растворяются в применяемых для ТФС растворителях.

Для создания амидной связи использовали карбодиимидный метод, соли фосфония/урония – реагент Кастро гексафторфосфат бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфония (ВОР) [17] или тетрафторборат *N,N,N',N'*-тетраметил-*O*-(бензотриазол-1-ил)урония (ТВТУ) [18].

Таблица 1. Сравнительная оценка синтезов метилина H-MeArg¹-Pro-Arg³-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH с постоянной и временной защитой остатков аргинина

Способ защиты функциональных групп аргинина				Конденсирующий реагент	Состав деблокирующей смеси и время реакции	Содержание метилина в сыром продукте ТФС, %	Способ очистки и чистота (%) по ВЭЖХ		Выход* метилина, %
MeArg ¹		Arg ³					ИОХ	ИОХ + ВЭЖХ	
N ^α	N ^G	N ^α	N ^G						
Схема с постоянной защитой гуанидиновых групп остатков Arg ¹ и MeArg ³									
Fmoc	Mtr	Fmoc	Pmc	TBTU/NMM	TFA/тиоанизол/ вода/TIBS 16 ч	60–65	90	97	49–60
Схема с временной защитой гуанидиновых групп остатков Arg ¹ и MeArg ³ протонированием (солеобразованием)									
Voc	H ⁺	Fmoc	H ⁺	BOP	TFA/вода/TIBS 1.5–2.0 ч	68–75	98	–	58–65

* Выход приведен в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру.

Важным нюансом конденсации производных N^G-незащищенного аргинина с использованием BOP или TBTU является возможность проведения реакции без применения органического основания. Обычно при использовании BOP и TBTU в ТФС для активации карбоксильной группы применяют 2–3 эквивалента органического основания (диизопропилэтиламина или N-метилморфолина), необходимого для связывания кислых противоионов — гексафторфосфата или тетрафторбората. Известно, что избытки оснований способны привести к рацемизации присоединяемой аминокислоты. В случае активации карбоксильной группы Fmoc-Arg-OH или Fmoc-MeArg-OH в присутствии BOP или TBTU их гуанидиновая группа (с pK_a ≈ 12.5) играет роль органического основания, являясь акцептором кислых противоионов и при этом происходит ее блокирование.

Дополнительным преимуществом этого способа конденсации является тот факт, что активированное производное аргинина получается *in situ* в условиях непрерывного технологического процесса, т.е. не требуется введения дополнительной стадии приготовления активированных производных аргинина.

В наших экспериментах лучшие результаты на стадии введения в пептидную цепь остатков аргинина были получены при 2-кратном проведении соответствующих конденсаций с использованием BOP или TBTU (см. табл. 1). В работе [14] было показано, что в ходе ТФС на стадии деблокирования N^G-незамещенного Arg-содержащего пептидполимера пиперидиновым реагентом происходит депротонирование гуанидиновой функции. Для предотвращения возможного ацилирования

гуанидина при следующей стадии конденсации, мы применяли 5-минутную промывку аминсвободного Arg-пептидполимера 5% раствором НОВТ в DMF или NMP непосредственно перед введением следующей аминокислоты. Оказалось, что эта дополнительная обработка исчерпывающе защищает гуанидиновую группу остатков аргинина протонированием и не препятствует ацилированию α-аминогруппы Arg-пептида, сидящего на полимере. Кроме того, в отличие от бромгидрата пиридина, 1-гидроксibenзотриазол хорошо растворим в органических растворителях, и его растворы в вышеприведенных растворителях устойчивы при хранении.

В табл. 1 дана сравнительная оценка результатов синтеза метилина по традиционной схеме ТФС с постоянными защитами гуанидиновой функции остатков аргинина (как описано в работе [8]) и с временной защитой аргининов протонированием, а на рис. 1 представлены профили аналитической ВЭЖХ соответствующих “сырых” продуктов ТФС. С точки зрения выхода целевого пептида обе схемы синтеза дают сопоставимые результаты, однако состав “сырого” продукта, полученного с использованием незащищенного аргинина, благодаря отсутствию трудноотделимых примесей позволяет получить пептид с чистотой более 98% в одну стадию с помощью ионообменной хроматографии (см. рис. 1а и б). Чистота пептида подтверждена данными ВЭЖХ, а структура пептида — данными масс-спектрометрии и ¹H-ЯМР-спектроскопии, представленными в табл. 2.

Таким образом, разработанная методика получения метилина с временным блокированием гу-

Таблица 2. Химические сдвиги (δ , м.д.) сигналов протонов метилина в DMSO- d_6 (300 K)

Протоны	MeArg ¹	Pro ²	Arg ³	Leu ⁴	Ser ⁵	His ⁶	Lys ⁷	Gly ⁸	Pro ⁹	Nle ¹⁰	Pro ¹¹	Phe ¹²
N ^{α} H	8.92, 8.78	—	8.31	7.78	8.1	8.3	8.14	8.19	—	7.96	—	7.98
C ^{α} H	4.22	4.46	4.21	4.39	4.285	4.59	4.29	3.98, 3.86	4.36	4.385	4.355	4.38
C ^{β} H	1.78, 1.52	2.14, 1.78	1.77, 1.52	1.54, 1.41	3.54, 3.758	3.10, 2.99	1.67, 1.52		2.01, 1.08	1.41	2.02, 1.80	3.01, 2.91
C ^{γ} H		1.87							1.83		1.83	
C ^{δ} H		3.45, 3.72		0.85, 0.82					3.58, 3.46		3.58, 3.46	
N ^{α} Me	2.52											

анидиновых функций остатков аргинина на стадии его включения в пептид с использованием традиционных для ТФС реагентов образования амидной связи позволяет существенно упростить пост-синтетические процедуры и последующую очистку сырого продукта.

Изучение протеолитической деградации метилина с помощью спектроскопии протонного магнитного резонанса. Следующим этапом работы было сравнительное изучение протеолитической стабильности апелина-12 и метилина в плазме крови человека. Пептиды в биологических системах подвергаются быстрому ферментативному гидролизу, что существенно ограничивает их практическое применение. Изучение протеолитической стабильности пептидов и путей их деградации дает важную информацию, необходимую для целенаправленного создания протеолитически устойчивых соединений, в частности, путем защиты участков пептидной цепи с преимущественно гидролизруемыми амидными связями. Задача количественного определения введенных в организм пептидов представляется достаточно сложной, требует разработки специальных подходов и до сих пор во многом остается нерешенной.

В настоящее время для изучения протеолитической деградации пептидов *in vivo* и *in vitro* применяют различные методы. Одним из подходов к исследованию метаболизма пептидов является использование в этом анализе аналогов изучаемых пептидов, содержащих изотопные метки. Так, биодеградацию семакса, селанка, [Leu]энкефалина и гексапептидного фрагмента фактора дифференцировки лейкоцитов (HLDF-6-амида) исследовали с помощью равномерно меченных тритием аналогов этих пептидов, а для анализа меченых соединений применяли ВЭЖХ [19, 20].

Наиболее часто для изучения биодеградации пептидов используется комбинация ВЭЖХ с масс-спектрометрией [21]. Авторы работы [22] разработали чувствительный метод определения присутствующих в плазме крови человека апелинов-12, -13, -17, -36, и [Pyr¹]апелина-13, основанный на катионообменной экстракции апелиновых пептидов из плазмы крови с последующей мультиплексной жидкостной хроматографией/тандемной масс-спектрометрией (LC/MS/MS). В этой работе для количественной оценки каждой из апелиновых форм использовались внутренние стандарты апелинов-12, -13, -17, -36 и [Pyr¹]апелина-13, содержащие стабильные изотопы ¹³C и ¹⁵N.

Для анализа ферментативных превращений пептидов в различных биологических системах используется также ЯМР-спектроскопия [23–26]. Высокая степень индивидуальности спектров ЯМР [27] пептидов дает возможность непосредственно в ходе ферментативного гидролиза определить как качественный, так и количественный состав образующихся продуктов распада. При этом, что особенно важно, для идентификации структуры продуктов гидролиза не требуется их выделения из биологической смеси [23–26]. Метод позволяет, используя один образец пептида, непрерывно следить за кинетикой его гидролиза. Одним из ограничений метода является его относительно низкая чувствительность. Поэтому приходится работать в области концентраций пептидов, заметно превышающих фармакологические. Тем не менее, метод непрерывной регистрации гидролиза пептидов удобен при изучении взаимосвязи структуры и ферментативной стабильности в рядах пептидных аналогов. Ранее мы успешно использовали ¹H-ЯМР для сравнительной оцен-

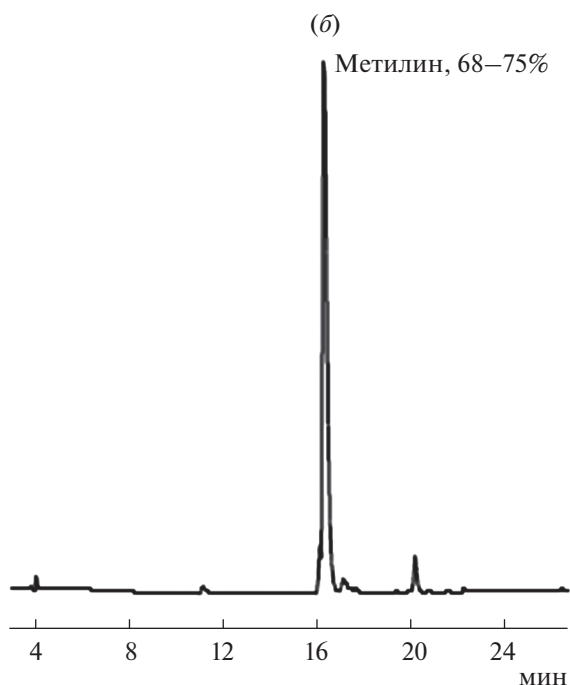
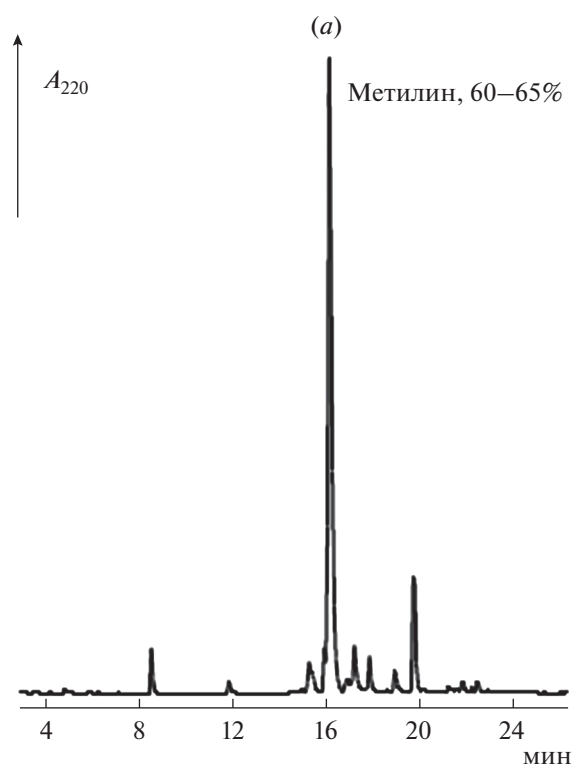


Рис. 1. Аналитическая ВЭЖХ “сырых” продуктов ТФС метилина с постоянной (а) и временной (б) защитой остатков аргинина. Колонка Kromasil 100 С18, 5 мкм, 4.6 × 250 мм. Пептиды элюировали со скоростью 1 мл/мин градиентом буфера Б в буфере А от 10 до 70% за 30 мин, буфер А – 0.05 М KH_2PO_4 , рН 3.0, буфер Б – 70% ацетонитрил в буфере А, детекция при 220 нм.

ки протеолитической стабильности ряда пептидных ингибиторов киназы легких цепей миозина [28, 29].

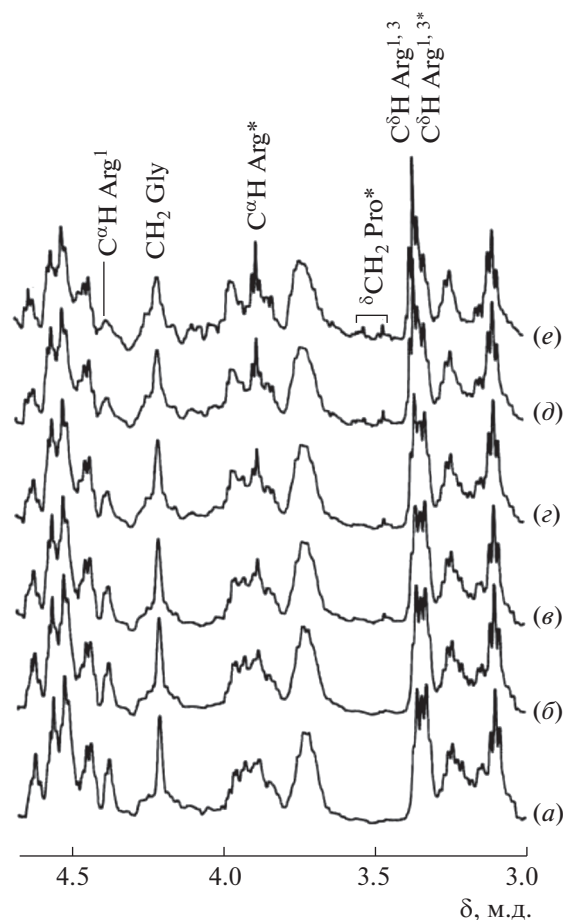


Рис. 2. Фрагменты спектров ^1H -ЯМР апелина-12 в плазме крови человека (после вычитания спектра плазмы), полученные через 20 (а), 100 (б), 210 (в), 400 (г), 600 (д) и 800 мин (е) после добавления пептида в плазму. Сигналы протонов остатков аминокислот – продуктов протеолитической деградации помечены символом *.

Фрагменты спектров ЯМР природного апелина-12 в плазме крови человека, полученные через различные промежутки времени после его добавления в плазму крови человека, даны на рис. 2. Сравнение этих спектров показывает, что амплитуда сигналов пептида при 4.37 и 3.35 м.д., относящихся к протонам C^αH - и $\text{C}^\delta\text{H}_2$ -групп остатков Arg^1 в составе пептида, со временем уменьшается; при этом в спектрах появляются новые, более узкие, сигналы при 3.88 и 3.35 м.д., амплитуда которых со временем увеличивается. Эти сигналы отнесены, соответственно, к протонам C^αH - и $\text{C}^\delta\text{H}_2$ -групп свободного аргинина, что было подтверждено неизменностью химических сдвигов этих сигналов при добавлении аминокислоты – аргинина в раствор. Сигналов других свободных аминокислот, в частности, C -концевого Phe^{12} на начальном этапе деградации обнаружено не было.

Следовательно, первоначальной стадией деградации апелина-12 является гидролиз связи $\text{Arg}^1\text{--Pro}^2$ N -концевой части пептида с образованием свободного аргинина. Время полудеградации N -концевой части апелина-12 в плазме крови оказалось равным приблизительно 2 ч 45 мин. Значительное перекрывание сигналов протонов $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ -групп остатков Arg^1 (3.35 м.д.) и Arg^3 (3.32 м.д.) в составе апелина-12, а также и $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ -протонов отщепившегося свободного аргинина при 3.35 м.д. затрудняет получение информации о пути распада и времени полужизни этого пептида в плазме. В дальнейшем, после трехчасовой инкубации апелина-12 в плазме, кроме сигналов протонов свободного аргинина, в спектрах появляются сигналы и других свободных аминокислот: $\delta\text{-CH}_3$ -группы свободного Leu^4 при 1.05, 1.06 м.д., $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ -пролина при 3.45, 3.52 м.д., а также протонов ароматического кольца C -концевого Phe^{12} .

Кинетическая картина (рис. 3) изменения амплитуды сигналов протонов ($\text{C}^{2,6}\text{H}$, C^4H , $\text{C}^{3,5}\text{H}$) ароматического кольца C -концевого остатка Phe^{12} и, в первую очередь, амплитуды сигналов протонов $\text{C}^{3,5}\text{H}$ отщепившегося фенилаланина при 7.53 м.д. позволила оценить время полужизни C -концевого остатка Phe^{12} в апелине-12 в плазме крови, которое оказалось близким к 8 ч. Следовательно, скорость отщепления C -концевого остатка Phe^{12} в плазме, по крайней мере, в три раза меньше скорости гидролиза связи $\text{Arg}^1\text{--Pro}^2$ в N -концевой части апелина-12. Таким образом, определяющей фактором в деградации апелина-12 в плазме крови является последовательное отщепления N -концевых аминокислотных остатков, начиная с отщепления Arg^1 .

В отличие от апелина-12 в спектрах метилина не наблюдается каких-либо существенных изменений амплитуды сигналов протонов аминокислотных остатков N -концевой части пептида, по крайней мере в первые 4 ч его инкубации в плазме (рис. 4). В частности, не изменяется амплитуда сигналов протонов $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ -групп (3.34 м.д.) остатков MeArg^1 , Arg^3 , а также протонов метильной группы MeArg^1 при 2.63 м.д., т.е. связь $\text{MeArg}^1\text{--Pro}^2$ в метилине не гидролизуются. Ранее также было показано, что метилирование N -концевых остатков в пептидах в значительной степени защищает их от действия аминопептидаз [26, 27]. Время полужизни метилина в плазме крови определяется только скоростью отщепления C -концевого остатка Phe^{12} , свидетельством чего является, как и в случае апелина-12, появление в спектрах метилина, например, сигналов протонов ароматического кольца свободного фенилаланина- $\text{C}^{3,5}\text{H}$ при 7.53 м.д. Скорость отщепления остатка Phe^{12}

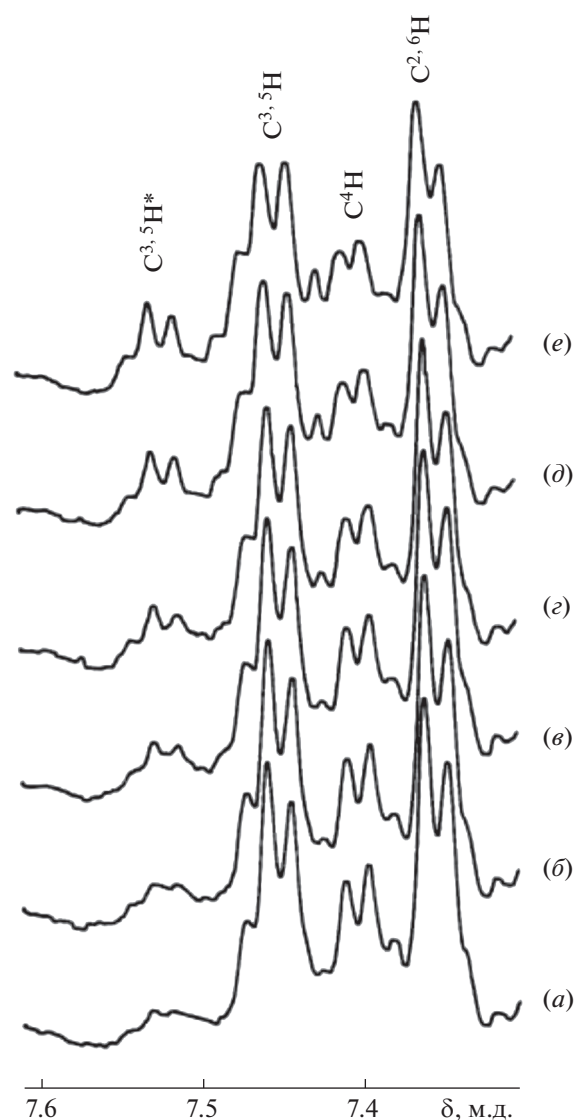


Рис. 3. Фрагменты спектров ^1H -ЯМР апелина-12 в плазме крови человека (после вычитания спектра плазмы), полученные через 300 (а), 500 (б), 700 (в), 850 (г), 1000 (д) и 1300 мин (е) после добавления пептида в плазму. Сигналы протонов остатка фенилаланинина — продукта протеолитической деградации помечены символом *.

в метилине практически такая же, как в апелина-12 и близка к 8 ч.

Разумеется, значения времен полужизни пептидов, полученные в экспериментах *in vitro*, не соответствуют времени их реальной сохранности в кровотоке, т.к. в этих экспериментах концентрации пептидов существенно выше, а активность ферментов плазмы крови ниже, чем в физиологических условиях. Кроме того, следует отметить значительное уширение сигналов рассмотренных пептидов в плазме крови по сравнению с их раствором в D_2O без заметного изменения их хими-

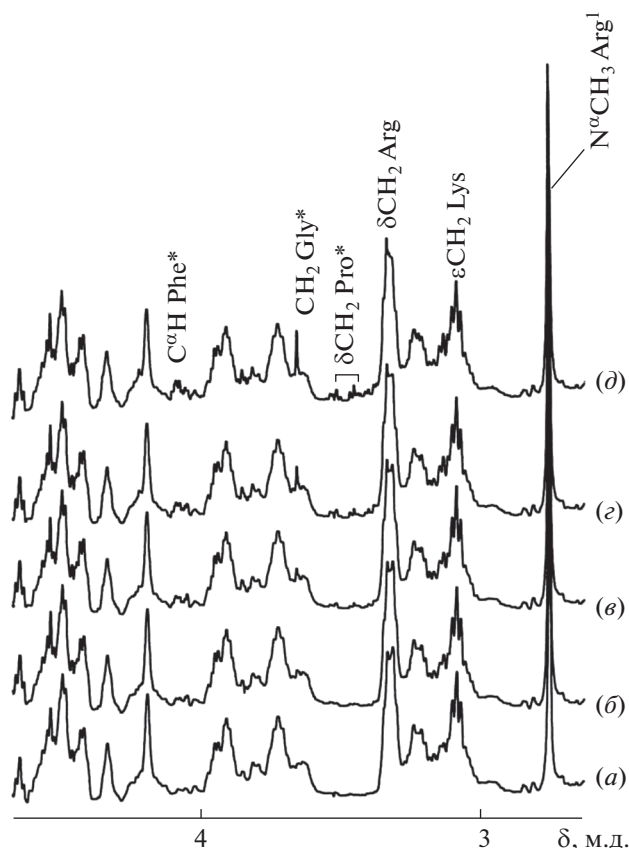


Рис. 4. Фрагменты спектров ^1H -ЯМР метилина в плазме крови человека (после вычитания спектра плазмы), полученные через 20 (а), 300 (б), 500 (в), 700 (г) и 1000 мин (д) после добавления пептида в плазму. Сигналы протонов остатков аминокислот – продуктов протеолитической деградации помечены символом *.

ческих сдвигов. Этот факт можно объяснить обратимым связыванием пептидов с компонентами плазмы крови, что может приводить к увеличению времени их распада. Однако проведенные сравнительные эксперименты позволяют построить ряд относительной устойчивости пептидов к протеолитической деградации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможность использования модифицированных пептидов аполина в качестве потенциальных лекарственных средств для терапии сердечно-сосудистых заболеваний диктует необходимость разработки оптимизированных способов синтеза этих соединений и изучения их стабильности в биологических системах. Представленная схема получения метилина исключает возможность образования побочных продуктов сульфатирования гидроксильной группы остатка серина, что обеспечивает упрощение пост-синтетических процедур и очистки пептида. Исследование

протеолитической стабильности метилина с помощью ^1H -ЯМР выявило существенное возрастание времени полужизни пептида в плазме человека по сравнению с природным аполином-12. Такие свойства могут повысить эффективность внутривенного введения метилина больным с различной патологией сердца, а также обосновывают возможность его использования в составе комплекса мер, направленных на защиту миокарда, при проведении операций на открытом сердце. Эти результаты являются принципиально важными для организации экспериментального производства метилина и его запланированных клинических испытаний в ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы производные *L*-аминокислот (Fluka, NovaBiochem и Bachem Швейцария), BOP, HOBT, TBTU, NMM (Fluka, Швейцария), TIBS (Sigma-Aldrich, США). Для синтеза применяли DMF, *N*-метилпирролидон (NMP), дихлорметан, 4-метилпиперидин и TFA (Fluka, Швейцария). Для синтеза и очистки пептидов использовали ацетонитрил и изопропиловый спирт (Panreac, Испания). Аналитическую ВЭЖХ пептидов проводили на приборе Knauer (ФРГ) на колонке Kromasil (Швеция) 4.6×250 мм, 5 мкм; пептиды элюировали со скоростью 1 мл/мин градиентом буфера Б в буфере А: от 10 до 70% за 30 мин, буфер А – 0.05 М KH_2PO_4 , pH 3.0, буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А, детекция при 220 нм. Препаративную ВЭЖХ пептидов проводили на приборе Knauer (ФРГ) на колонке Диасорб С16 130Т (25×250 мм), размер частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А – 0.01 М NH_4OAc , pH 4.5, буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А. Пептиды элюировали градиентом 0.5% в минуту буфера Б в буфере А от 100% буфера А со скоростью 10 мл/мин, детекция при 226 нм.

Ионообменную хроматографию проводили на колонке с CM-сефадексом (Sigma-Aldrich, США) 25×700 мм, пептиды элюировали линейным градиентом концентрации пиридин-ацетатного буфера с pH 4.5 от 0.05 до 2 М.

ЯМР-спектры сняты 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 и масс-спектрометрии (масс-спектры регистрировали на приборе VISION 2000, Termbioanalysis corp., Finnigan, США).

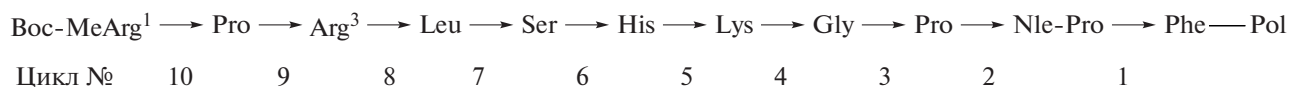


Схема 2. Твердофазный синтез метилина.

Автоматический твердофазный синтез метилина проводили согласно схеме 2 на синтезаторе Tribute-UV (Protein Technologies Inc., США), начиная с 0.83 г (0.5 ммоль) Fmoc-Phe-полимера (Sigma-Aldrich, США) с содержанием стартовой аминокислоты 0.60 ммоль/г. ТФС метилина в ручном варианте проводили, исходя из 2.5 г (1.5 ммоль) того же аминокислотного полимера.

На приведенной выше схеме циклы ТФС пронумерованы в соответствии с последовательностью присоединения аминокислот. Протокол ТФС для циклов 1–7 был стандартным и включал следующие стадии: деблокирование α-аминогрупп раствором 5% 4-MePip и 2% DBU (1,8-диазабисцикло[5.4.0]-ундец-7-ен) в DMF 5 мин (в программу была включена функция спектрофотометрического контроля полноты отщепления Fmoc-защиты); промывки DMF; присоединение 4-х кратного избытка Fmoc-AA в присутствии TBTU/NMM в DMF в течение 1.5 ч; промывки DMF. В циклах 8 и 10 для присоединения Fmoc-Arg-OH и Woc-N^αMe-Arg-OH соответственно проводили двойные конденсации. Вариант 1 – к раствору 2.0 ммоль Fmoc-Arg-OH и 2.0 ммоль HBr-Py в 15 мл смеси DMF/NMP 1 : 1, добавляли 2.0 ммоль DIC и 2.0 ммоль HOBT и эту смесь прибавляли к пептидилполимеру, перемешивали 1.5 ч, после чего пептидилполимер промывали DMF и конденсацию повторяли с теми же количествами реагентов. Вариант 2 – к раствору 2.0 ммоль Fmoc-Arg-OH и 4.0 ммоль HOBT в 15 мл смеси DMF/NMP 1 : 1, прибавляли 2.0 ммоль DIC и смесь прибавляли к пептидилполимеру, перемешивали 1.5 ч, пептидилполимер промывали DMF и конденсацию повторяли. Вариант 3 – смесь 2.0 ммоль Fmoc-Arg-OH + 2.0 ммоль BOP растворяли в 10 мл DMF в течение 4 мин, прибавляли к пептидилполимеру и перемешивали 1.5 ч, после промывок конденсацию повторяли. Кроме того, в двух заключительных циклах синтеза – 9 и 10 перед конденсацией в протокол была включена дополнительная промывка α-аминодеблокированного пептидилполимера 5% раствором HOBT в DMF в течение 5 мин. Деблокирование и отщепление додекапептида от полимера осуществляли действием смеси TFA–вода–TIBS (95 : 2.5 : 2.5), после осаждения пептида и промывок диэтиловым эфиром полученный продукт очищали с помощью ИОХ до 98%-й чистоты (по данным ВЭЖХ в вышеуказанных условиях). Структуру полученного пептида подтверждали данными ¹H-ЯМР-спектроскопии, приведенными в табл. 2. Масс-спектр: найдено *m/z* 1418.866; *M*_{расчет.} = 1418.7.

Получение плазмы крови. Плазму получали из крови здорового донора путем осаждения клеточных элементов и ультрацентрифугирования в градиенте плотности NaBr в течении 48 ч при 4°C для удаления фракции липидов. Плазму без липидов диализовали в фосфатно-солевом буфере (2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 136.89 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7.1–7.4), лиофилизовали и растворяли в D₂O.

¹H-ЯМР-анализ деградации пептидов. Химические сдвиги сигналов в ¹H-ЯМР-спектрах были измерены относительно внутреннего стандарта – натриевой соли 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфата. Отнесение сигналов к определенным группам протонов аминокислотных остатков проводилось с помощью метода дифференциального двойного резонанса. Для выделения сигналов, принадлежащих протонам пептида, применялась разностная спектроскопия: из каждого спектра, полученного после добавления пептида в плазму крови, вычитался спектр свободной плазмы. Концентрация пептида в образце составляла 2–2.5 мг/мл.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Минздрава России (НИР № 20180201-27).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pitkin S., Maguire J., Bonner T., Davenport A. // *Pharmacol. Rev.* 2010. V. 62. P. 331–342.
2. Tatamoto K., Takayama K., Zou M.X., Kumaki I., Zhang W., Kumano K., Fujimiyama M. // *Regul. Pept.* 2001. V. 99. P. 87–92.
3. Писаренко О.И., Шульженко В.С., Пелогейкина Ю.А., Студнева И.М., Кхатри А.Н., Беспалова Ж.Д., Азьмуко А.А., Сидорова М.В., Палькеева М.Е. // *Кардиология.* 2010. Т. 50. № 10. С. 44–49.
4. Писаренко О.И., Серебрякова Л.И., Пелогейкина Ю.А., Студнева И.М., Кхатри Д.Н., Цкитишвили О.В., Беспалова Ж.Д., Азьмуко А.А., Сидорова М.В., Палькеева М.Е. // *Бюлл. экск. биологии и медицины.* 2011. Т. 152. № 7. С. 86–89.
5. Juhl C., Els-Heindl S., Schenauer R., Redlich G., Haaf E., Wunder F., Riedl B., Burkhardt N., Beck-Sickingher A.G., Bierer D. // *ChemMedChem.* 2016. V. 11. P. 2378–2384.
6. Murza A., Belleville K., Longpré J.-M., Sarret P., Marsault E. // *Biopolymers (Peptide Science).* 2014. V. 102. № 4. P. 297–303.
7. Писаренко О.И., Шульженко В.С., Пелогейкина Ю.А., Палькеева М.Е., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Молокоядов А.С., Беспалова Ж.Д., Терещенко С.Н., Ма-

- сенко В.П. Патент РФ № 2457216 от 21.12.2010, опубл. 27.07.2012. Бюл. № 21.
8. Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Палькеева М.Е., Молокоедов А.С., Бушув В.Н., Дворянцев С.Н., Шульженко В.С., Пелогейкина Ю.А., Писаренко О.И., Беспалова Ж.Д. // Биоорг. химия. 2012. Т. 38. № 1. С. 40–51. [Sidorova M.V., Az'muko A.A., Pal'keeva M.E., Molokoedov A.S., Bushuev V.N., Dvoryantsev S.N., Shulzhenko V.S., Pelogeykina Yu.A., Pisarenko O.I., Bepalova Zh. D. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2012. V. 38. № 1. P. 30–40.]
 9. Лакомкин В.Л., Абрамов, А.А., Лукошкова Е.В., Лакомкин С.В., Грамович В.В., Выборов О.Н., Ундровина Н.А., Ермишкин В.В., Цыплёнок В.Г., Ширинский В.П., Капелько В.И. // Кардиология. 2015. Т. 55. № 6. С. 54–62.
 10. Пелогейкина Ю.А., Серебрякова Л.И., Цкитишвили О.В., Студнева И.М., Писаренко О.И. // Кардиологический вестник. 2014. № 3. С. 54–63.
 11. Synthetic Peptides: a User's Guide / Ed. by Grant G.A. 2nd ed. New York, Oxford Univ. Press 2002.
 12. Шредер Э., Любке К. Пептиды. Т. 1.: Пер. с англ. М.: Мир, 1967 (Schröder E., Lübke K. The Peptides. V. 1. New York; London: Academic Press, 1965).
 13. Coy D., Branyas N. // Int. J. Pept. & Prot. Res. 1979. V. 14. P. 339–343.
 14. Рубина А.Ю., Беспалова Ж.Д., Бушув В.Н. // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С. 263–272. [Rubina A. Yu., Bepalova Zh.D., Bushuev V.N. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2000. V. 26. № 4. P. 235–244.]
 15. Сидорова М. В., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д., Бушув В.Н. // Биоорг. химия. 1997. Т. 23. С. 46–55. [Sidorova M.V., Molokoedov A.S., Ovchinnikov M.V., Bepalova Zh.D., Bushuev V.N. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 1997. V. 23. P. 41–50.]
 16. Xue C.-B., LeGrado W.F. // Tetrahedron Lett. 1995. V. 36. P. 55–58.
 17. Castro B., Dormoy J.R., Evin G., Selve C. // Tetrahedron Lett. 1975. V. 14. P. 1219–1222.
 18. Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillessen D. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. P. 1927–1930.
 19. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Долотов О.В., Козик В.С., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Дорохова Е.М., Мешавкин В.К., Иноземцева Л.С., Габаева М.В. и др. // Биоорг. химия, 2006. Т. 32. С. 183–191. [Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Dolotov O.V., Kozik V.S., Kost N.V., Sokolov O.Yu., Dorokhova E.M., Meshavkin V.K., Inozemtseva L.S., Gabaeva M. et al. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2006. V. 32. P. 166–173.]
 20. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Кост Н.В., Воеводи-на М.Э., Соколов О.Ю., Козик В.С., Шрам С.И., Азев В.Н., Бочаров Э.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Мясоедов Н.Ф. // Биоорг. химия. 2015. Т. 41. № 6. С. 644–656.
 21. Esposito S., Mele R., Ingenito R., Bianchi E., Bonelli F., Monteagudo E., Orsatti L. // Anal. Bioanal. Chem. 2017. V. 409. P. 2685–2696.
 22. Mesmin C., Dubois M., Becher F., Fenaille F., Egan E. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2010. V. 24. P. 2875–2884.
 23. Jardetzky O., Roberts G.C.K. NMR in Molecular Biology. New York; London: Acad. Press, 1981. 681 p.
 24. King G.F., Kuchel P.W. // Biochem. J. 1984. V. 220. P. 553–560.
 25. Исакова О.Л., Сенетов Н.Ф., Бушув В.Н., Беспалова Ж.Д., Виноградов В.А., Рууге Э.К., Тумов М.И. // Биоорг. химия 1986. Т. 12. С. 106–111.
 26. Сахаров И.Ю., Исакова О.Л., Сенетов Н.Ф., Беспалова Ж.Д., Рууге Э.К. // Биохимия. 1987. Т. 52(2). С. 311–316.
 27. Wüthrich K. NMR in Biological Research: Peptides and Proteins. New York: American Elsevier, 1976. 379 p.
 28. Секридова А.В., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Молокоедов А.С., Бушув В.Н., Марченко А.В., Шербак-кова О.В., Ширинский В.П., Беспалова Ж.Д. // Био-орг. химия. 2010. Т. 36. № 4. С. 498–504. [Sekridova A.V., Sidorova M.V., Az'muko A.A., Molokoedov A.S., Bushuev V.N., Marchenko A.V., Shcherbakova O.V., Shirinskii V.P., Bepalova Zh.D. // Russ. J. Bioorganic-Chemistry. 2010. V. 36, № 4. P. 461–467.]
 29. Khapchaev A.Y., Kazakova O.A., Samsonov M.V., Sidorova M.V., Bushuev V.N., Vilitkevich E.L., Az'muko A.A., Molokoedov A.S., Bepalova Zh.D., Shirinsky V.P. // J. Pept. Sci. 2016. V. 22. P. 673–681.]

Optimization of the Synthesis of the Structural Analogue of Apelin-12 and the Study of Its Stability in Human Plasma by the NMR Method

M. V. Sidorova*, #, M. E. Palkeeva*, A. A. Azmuko*, M. V. Ovchinnikov*,
A. S. Molokoedov*, V. N. Bushuev*, and O. I. Pisarenko*

Phone: +7 (495) 414-6716; e-mail: peptide-cardio@yandex.ru

*National Cardiology Research Center, Tretya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

A method for solid-phase synthesis of the analogue of apelin-12 using the Fmoc methodology was developed in combination with the temporary protection of the guanidine function of arginine residues by protonation (salt formation) during the formation of the amide bond. With the help of proton magnetic resonance spectroscopy, a comparative evaluation of the proteolytic stability for of apeline-12 and its structural analogue in human blood plasma was carried out; it is shown that the half-life of an analogue in plasma is about three times greater than that of a natural peptide.

Keywords: apelin-12, MeArg¹, Nle¹⁰-analogue, solid phase peptide synthesis, proteolytic stability, NMR spectroscopy