

УДК 547-327+54.057

ТВЕРДОФАЗНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ

© 2010 П.П. Пурыгин, О.С. Срибная, Е.А. Степанов, А.А. Данилин,¹
А.К. Буряк²

С помощью твердофазного синтеза был получен не известный ранее тетрапептид, который был модифицирован путем введения в структуру исходного пептида адамантальных фрагментов. Модификация пептида адамантаном должна усилить его биологическую активность за счет повышения липофильности молекулы и, как следствие, увеличения степени ее сродства к мембранам клеток. Структуры синтезированных пептидов подтверждены физико-химическими методами.

Ключевые слова: пептиды, адамантан, твердофазный синтез, антивирусная активность, компьютерный расчет биологической активности.

Введение

Последние двадцать лет наряду с сообщениями об открытии новых природных биологически активных полипептидов и результатами их исследования приводятся данные о биологической активности синтетических аналогов, сконструированных на основе уже известных природных пептидов. Природные пептиды могут обладать побочным гемолитическим действием, что ограничивает их использование в качестве лечебных препаратов. При разработке лекарственных препаратов на основе антибактериальных пептидов проводят их химическую модификацию с целью снижения токсиче-

¹Пурыгин Петр Петрович (Purygin2002@mail.ru), Срибная Олеся Сергеевна (elektromodel@mail.ru), Степанов Евгений Александрович (samarec@list.ru), Данилин Андрей Александрович (zver_nauki@mail.ru), кафедра органической, биоорганической и медицинской химии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

²Буряк Алексей Константинович (AKBuryak@ipc.rssi.ru), лаборатория физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, 119991, Россия, г. Москва, пр. Ленинский, 31(4).

ского действия и предотвращения протеолитического расщепления в организме [1]. Синтетические аналоги часто обладают активностью, порой превосходящей активность родительских пептидов. С помощью химического синтеза можно получить варианты активных пептидов с измененными свойствами, что открывает новые возможности для изучения механизма их действия, а также влияния отдельных аминокислотных остатков и пространственной структуры на биологическую активность [2].

При анализе структуры известных биологически активных пептидов насекомых видов *Diptera* и *Lepidoptera* с антимикробными, противогрибковыми и потенциальными противовирусными и иммуномоделирующими свойствами нами выявлено наличие часто встречающегося сочетания аминокислот КПК, КI, К. Мы предположили, что именно эти фрагменты могут обуславливать биологическую активность.

Производные адамантана довольно давно и широко применяются в медицине и фармакологии. Эти соединения проявляют достаточно широкий спектр биологической активности: противогрибковая, противомикробная, нейрпсихотропная, противовирусная. Наиболее известными являются противовирусные свойства производных адамантана. Считается, что особенности биологического действия производных адамантана во многом связаны с наличием объемного и высоколипофильного каркасного ядра. Липофильность адамантанового ядра определяет возможность непосредственного взаимодействия молекул его замещенных производных с биологическими мембранами, содержащими липидный слой, а также с гидрофобными фрагментами белков, в том числе входящими в структуру рецепторных образований. Высокая липофильность и объемная структура адамантанового радикала при его введении в молекулы различных биологически активных соединений в значительной мере модифицируют их фармакологическое действие [3].

Результаты и их обсуждение

Образование пептидной связи между двумя немодифицированными аминокислотами осуществляется в жестких условиях. Поэтому синтез осуществляют через образование промежуточных амидных соединений. В его основе лежит реакция конденсации между незащищенной аминогруппой одного аминокислотного остатка и активированной карбоксильной группой другого.

Для успешного протекания этой реакции необходимо "активировать" карбоксильную группу, т. е. необходимо увеличить электрофильность карбонильного углерода. Это может быть достигнуто путем ее химической модификации, что обычно и определяет название метода твердофазного пептидного синтеза. Реакции синтеза на протяжении длительного времени совершенствовались и к настоящему моменту включает три стадии [4, 5].

На первой стадии необходимо селективным образом блокировать (защитить) функциональные группы, которые могут принимать участие в образовании побочных продуктов. Различают временные и постоянные защитные группы. Временные защитные группы служат для защиты концевых α -амино- и карбоксильных групп, если они не принимают участие в образовании пептидной связи.

Постоянные защитные группы используются для блокирования боковых функций Ser, Thr, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Cys. Защита с этих функций снимается, как правило, после окончания синтеза.

Вторая стадия — активация карбоксильной группы, необходимая для осуществления реакции конденсации в мягких условиях, результатом которой является образование пептидной связи с выделением молекулы воды. Главная проблема второй стадии синтеза — исключить рацемизацию присоединяемого остатка, поскольку реакции протекают по группировке, связанной с асимметрическим центром.

Третью стадию, отщепление защитных групп, иногда проводят в два приема — в мягких и жестких условиях, чтобы свести к минимуму образование побочных продуктов.

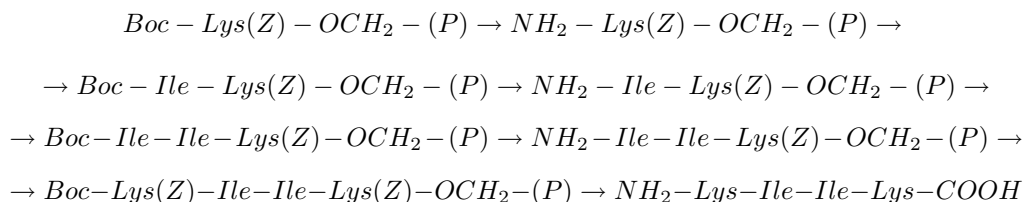
В связи с вышесказанным синтез тетрапептида проводили, следуя Вос-стратегии [6], с использованием стирол-дивинилбензольного сополимера (содержание дивинилбензола 1 %) в качестве твердого носителя.

Стандартный цикл включал промывку смолы DMF, удаление Вос-защиты, конденсацию активированной Вос-аминокислоты в среде HOBT. В каждом цикле Вос-группу удаляли 50 %-ной трифторуксусной кислотой в DCM и после нейтрализации остатков кислоты 5 % DIPEA в DCM, конденсацию проводили с пятикратным избытком активированной Вос-аминокислоты. С-концевой аминокислотный остаток вводили реакцией пятимолярного избытка дициклогексиламмонийной соли лизина с Вос-защищенной боковой аминогруппой в растворе DMF, активируемой TBTU и HOBT.

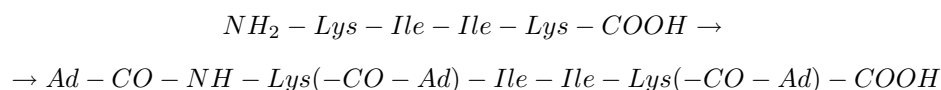
Контроль за полнотой прохождения реакции проводили нингидриновым методом и при необходимости реакцию конденсации повторяли.

Схема синтеза:

- Получение тетрапептида:



- Модификация тетрапептида:



Структуры полученных пептидов подтверждены физико-химическими методами. На рис. 1 представлен масс-спектр MALDI синтезированного пептида Lys-Ile-Ile-Lys. Сигналы, соответствующие пику молекулярного иона и ионам с Na, K, имеют более высокую интенсивность, чем протонированная молекула пептида. Это является характерным для данного метода масс-спектрометрии. При масс-спектрометрии продукта модификации получены сигналы, соответствующие пику молекулярного иона и ионам с Na, K (рис. 2).

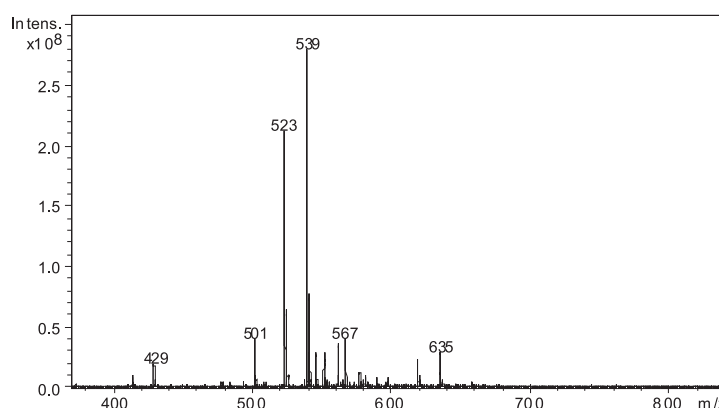


Рис. 1. Масс-спектр MALDI синтезированного пептида Lys-Ile-Ile-Lys [M+H] 501 m/z, [M+Na] 523 m/z, [M+K] 539 m/z

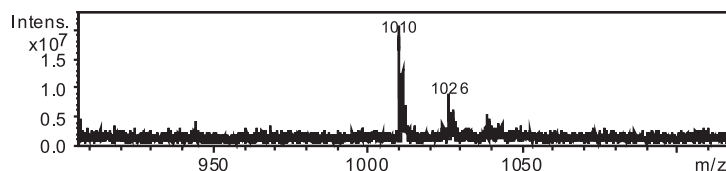


Рис. 2. Масс-спектр MALDI модифицированного пептида Ad-CO-Lys(-CO-Ad)-Ile-Ile-Lys(-CO-Ad)-COOH [M+Na] 1010 m/z, [M+K] 1026 m/z

Также было произведено компьютерное моделирование биологической активности полученных соединений.

Для предварительной оценки проявления биологической активности полученных соединений с помощью программы *PASS Professional* были рассчитаны показатели Pa и Pi. Величина Pa определяет вероятность проявления данным веществом конкретного вида биологической активности, а величина Pi вероятность не проявления данного вида биологической активности. Результаты расчетов представлены в таблице. Приведены первые 10 пунктов с самой большой вероятностью проявления активности, а также первые 3 пункта, соответствующие побочным эффектам и токсичности (полужирное начертание).

Из приведенных данных видно, что у модифицированного адамантаном пептида в небольшом количестве появляются новые виды биологической

активности, в основном же изменяются вероятности проявления тех видов активностей, которые были присущи и исходному пептиду.

Таблица

Рассчитанные вероятности проявления (P_a) и не проявления (P_i) различных видов биологической активности пептидов

Lys-Ile-Ile-Lys			Ad-CO-Lys(-CO-Ad)-Ile-Ile-Lys(-CO-Ad)-COOH		
Pa	Pi	Effects	Pa	Pi	Effects
0,913	0,005	Immunomodulator (HIV)	0,835	0,019	Immunomodulator (HIV)
0,862	0,006	Chemoprotective	0,708	0,015	Immunostimulant
0,766	0,009	Immunostimulant	0,723	0,031	Antineoplastic (lymphocytic leukemia)
0,753	0,008	Radioprotector	0,618	0,010	Hematopoietic
0,763	0,021	Antineoplastic (lymphocytic leukemia)	0,606	0,034	Immunomodulator
0,728	0,010	Immunomodulator	0,634	0,069	Antiviral (Arbovirus)
0,683	0,020	Antianemic	0,521	0,059	Chemoprotective
0,640	0,022	Antitoxic	0,477	0,087	Antiviral (Picornavirus)
0,570	0,043	Antialcoholic	0,397	0,013	Antimyopathies
0,607	0,086	Antiseborrheic	0,438	0,062	Antitoxic
0,701	0,072	Neurotoxic	0,266	0,069	Vasopressor
0,575	0,019	Hypertensive	0,355	0,173	DNA damaging
0,612	0,093	Hematotoxic	0,223	0,195	Hypertensive

Компьютерный расчет показал, что исходный тетрапептид обладает высокой иммуномодулирующей и иммуностимулирующей активностью.

Важнейшее изменение происходит в уменьшении токсичности модифицированного пептида. Очень часто многие вещества обладают высокими показателями биологической активности, но из-за высокой токсичности не находят должного применения в медицине и фармакологии. В нашем же случае при практически не изменившейся иммуномодулирующей активности токсичность уменьшилась в несколько раз.

В ходе дальнейших исследований планируется провести измерение токсичности и противовирусной активности полученных пептидов *in vivo*,

а также провести анализ предсказательной способности программы *PASS Professional*.

Экспериментальная часть

Приборы и материалы

В работе использовались растворители и реактивы (уксусная, соляная и серная кислоты, все неорганические соли) отечественного производства фирмы РЕАХИМ квалификации х.ч. или о.с.ч., которые в случае необходимости очищались и абсолютировались в соответствии с описанными методиками [7], и импортные реактивы фирм Fluka (Switzerland), Sigma (USA). Все используемые аминокислоты имели L-конфигурацию, производитель — фирма Reanal (Hungary). В твердофазном синтезе пептида использовали стартовый Boc-Lys(Z)-OCH₂-полимер (смола Wang от Nova Biochem, X = 0,55 ммоль/г полимера).

Тонкослойная хроматография проводилась на пластинках с силикагелем Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck (Germany).

MALDI-времяпролетный масс-спектрометр Ultraflex II Bruker (азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса до 20 Гц) фирмы Bruker Daltoniks (Германия).

Образцы для масс-спектрометрии MALDI готовили в тонком слое 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, используемой в качестве матрицы. На мишени смешивали по 20 мкл раствора образца и 0,3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл в 20 % ацетонитриле в воде с 0,5 % TFA) и полученную смесь высушивали на воздухе.

Методика синтеза тетрапептида

В специальный сосуд из пористого стекла (V=5 мл) для проведения твердофазного синтеза пептидов в неавтоматическом режиме помещали полимер Boc-Lys(Z)-OCH₂-P (200 мг, содержание Z=0,55 ммоль/г полимера) и 1 мл DCM. Полученную смесь встряхивали и наблюдали набухание полимера примерно в 5 раз.

Вос-группу удаляли 50 %-ной TFA в DCM (1 мл). Спустя 50 минут полимер отфильтровали. Далее трижды промывали 3 мл DCM, для того чтобы избавиться от реагентов. Реактор дважды промывали последовательно смесью t-BuOH / DMF (2:1), 5 % DIPEA в DCM (чтобы освободить NH₂ группы). Затем пропустили через реактор DMF, потом DCM.

Стадия 1. Присоединение изолейцина

Растворили Boc-Ile-OPfp (144 мг, 0,5 ммоль) и HOBt (27 мг, 0,2 ммоль) в 1 мл смеси DCM и DMF (1:1). Затем полученный раствор добавили в реактор. Спустя 72 часа трижды промывали 3 мл DCM, для того чтобы избавиться от реагентов.

Для оценки степени присоединения первого остатка взяли пробу на нингидриновый тест (проба Кайзера) [8]: перенесли несколько зерен полимера

в маленькую стеклянную пробирку и добавить 100 мкл раствора А (5 г нингидрина в 100 мл EtOH) и 20 мкл раствора В (80 г расплавленного фенола в 20 мл EtOH), 40 мкл раствора С (2 мл 0,001 М водного раствора KCN к 98 мл пиридина). Перемешали и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 минут. Результат нингидринового теста отрицательный (желтое окрашивание гранул полимера). Следовательно, реакция присоединения первого аминокислотного остатка прошла полностью.

Стадия 2. Затем вновь удалили Вос-защиту и снова присоединили изолейцин, как описано выше

Стадия 3. Присоединение лизина

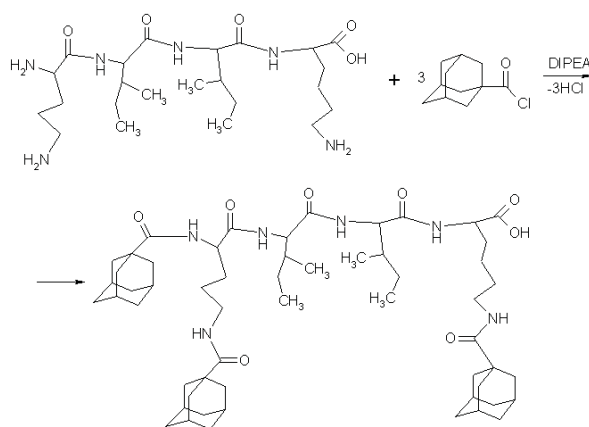
Растворили 280 мг (0,5 ммоль) (Z)-Lys(Woc)-OH-DCHA и 154 мг (0,5 ммоль) TBTU в 2 мл DMF и нанесли полученную смесь в реактор. Это привело к образованию активного сложного эфира. Раствор медленно впитывался. Добавили 0,1 экв. HOBT для ускорения реакции. Время реакции составило 3 часа. Для оценки степени присоединения первого остатка взяли пробу на нингидриновый тест (проба Кайзера). Результат нингидринового теста положительный (синее окрашивание гранул полимера). Положительная проба (синее окрашивание зерен полимера) означала то, что стадию присоединения следует повторить (до получения отрицательной пробы Кайзера). Удалили Вос-защиту.

Отщепление пептида с полимерной подложки: полимерную смолу промывали диэтиловым эфиром трижды по 2 мл (эфир сжимает гранулы, вытесняя тем самым растворитель), отфильтровывали, используя мембранный насос, и высушивали до постоянной массы в термостате. Затем добавляли к полимеру раствор ацетата палладия (186 мг) в 0,5 мл тетраметилмочевины (способствует набуханию полимера) и 1,5 мл DMF. В данную смесь также приливали 0,5 мл муравьиной кислоты (она разлагается на палладиевом катализаторе с образованием водорода и углекислого газа). Дополнительно в течение 12 часов пропускали через полученную смесь водород. Далее трижды промывали полимер последовательно порциями по 10 мл водного буфера (1М уксусная кислота — 20 % изопропанол) и по 1 мл DMF. Данный буфер одновременно сжимает гранулы и смывает пептид, а в DMF полимер, наоборот, набухает. Полученный раствор упаривали на ротационном испарителе. Полученный продукт смывали *изо*-пропанолом.

Далее пептид трижды отмывали диэтиловым эфиром, чтобы удалить воду и лишний растворитель. Смесь встряхивали и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5414, супернатант удаляли, осадок высушивали в вакуумном эксикаторе и взвешивали. Масса пептида 50,5 мг. Выход 92 %. Т.пл. 205 °С, Rf (элюент BuOH/AcOH/Py/вода 4/1/2/2) 0,45.

Модификация тетрапептида

Модификация состояла в синтезе триадамантильного производного пептида по следующей схеме:



0,065 г (0,0001263 моль) пептида растворили в смеси 1:1 MeOH и CHCl_3 и количественно перенесли в колбу на 30 мл. Затем добавили 86 мкл — 4-кратный избыток DIPEA (0,0005 моль), колбу закрыли хлоркальциевой трубкой и раствор перемешивали на магнитной мешалке 10 мин. Далее из делительной воронки медленно добавили раствор 0,15 г (0,0007578 моль) AdCOCl в 2,5 мл CHCl_3 (6-кратный избыток). Затем снова добавили 86 мкл — 4-кратный избыток DIPEA (0,0005 моль), снабдили установку обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, через 30 мин перемешивания колбу поместили на водяную баню с температурой 30 °С. Синтез проводили в течение 3 часов в условиях перемешивания.

Очистка: в реакционную смесь добавили дистиллированной воды, чтобы экстрагировать водорастворимые продукты. Для лучшего разделения фаз внесли в смесь хлорид натрия. Дальнейшую экстракцию проводили CHCl_3 . Затем в полученный раствор для обезвоживания добавили безводный сульфат магния. Суспензию отфильтровали на фильтре Шотте и растворитель удалили на роторном испарителе. Осадок затирали в диэтиловом эфире Et2O и избыток растворителя упарили на роторном испарителе. Масса полученного продукта составила 80 г. Выход 90 %. Т.пл. 156 °С, Rf (элюент гексан/этилацетат 2/1) 0,31

Выводы

Получен ранее неизвестный пептид Lys-Phe-Phe-Lys и продукт его модификации хлорангидридом адамантанкарбоновой кислоты Ad-CO-NH-Lys(-CO-Ad)-Phe-Phe-Lys(-CO-Ad)-COOH. Произведено предсказание биологической активности при помощи программного пакета *PASS Professional*. Среди предсказанного спектра биологической активности можно выделить интересующие нас иммуномодулирующие и иммуностимулирующие свойства (высокая вероятность) и противовирусные свойства (средняя вероят-

ность). Компьютерная оценка показала, что модификация пептида повышает вероятность проявления антивирусной и иммуностимулирующей активности. Кроме того, в результате модификации могут проявляться биологические свойства, не присущие исходному пептиду, а также существенно уменьшается токсичность, что играет важную роль в фармакологическом использовании полученных веществ.

На основе синтезированного пептида и продукта его модификации возможно создание лекарственных препаратов с иммуномодулирующими и иммуностимулирующими свойствами.

Список условных сокращений

- Ac — ацетил.
AcOH — уксусная кислота.
Ad — 1-адамантил.
Boc — *трет*-бутилоксикарбонильная защитная группа.
BuOH — *n*-бутанол.
DCHA — дициклогексиламин.
DCM — дихлорметан.
DIPEA — диизопропилэтиламин.
DMAP — 4-диметиламинопиридин.
DMF — N,N-диметилформамид.
HOBT — 1-гидроксibenзотриазол.
Et₂O — диэтиловый эфир.
I, Ile — изолейцин.
K, Lys — лизин.
OP_{Cl} — пентахлорфенил.
OP_F — пентафторфенил.
(P) — полимер (твёрдая фаза).
Py — пиридин.
TBTU — 1H-бензотриазол-1-ил-1,1,3,3-тетраметилмочевина тетрафторборат.
TFA — трифторуксусная кислота.
Z — карбобензоксизащитная группа.

Литература

- [1] Otvos L. Antibacterial peptides isolated from insects // J. Pept. Sci. 2000. V. 6. № 10. P. 497–511.
- [2] Таран С.А. Синтез и антибактериальная активность аналогов N-концевого фрагмента антимикробного пептида саркотоксина IA // Биоорганическая химия. 2002. Т. 28. № 5. С. 396–401.

- [3] Морозов И.С., Петров В.И., Сергеева С.А. Фармакология адамантанов. Волгоград: Волгоградская медицинская академия. 2001. 320 с.
- [4] Merrifield R.B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide // J. Am. Chem. Soc. 1963. № 85. P. 2149–2154.
- [5] Flouret G., Briher W., Mahan K. Wilson, L. Design of potent oxytocin antagonists featuring D-tryptophan at position 2 // J. Med. Chem. 1991. № 34. P. 642–646.
- [6] Stewart J.M. Young J.D. Solid Phase Peptide Synthesis. Rockford: Pierce Chemical Co., 1984. 176 p.
- [7] Гинзбург О.Ф. Лабораторные работы по органической химии. М.: Высшая школа, 1974. С. 51–55.
- [8] [8] Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides / E. Kaiser [et al.] // Anal. Biochem. 1970. № 34. P. 595–598.

Поступила в редакцию 20/I/2010;
в окончательном варианте — 20/I/2010.

SOLID-PHASE SYNTHESIS OF POTENTIAL VIRICIDE OF PEPTIDE CHARACTER

© 2010 P.P. Purygin, O.S. Sribnaya, E.A. Stepanov, A.A. Danilin,³
A.K. Buryak⁴

Using solid-phase synthesis tetra peptide was obtained, which was modified by introducing into the structure of the original peptide adamantane fragments. Modification of peptide adamantane should strengthen its biological activity by increasing the lipophilicity of the molecule and as a consequence by increasing the degree of its affinity to the membranes of cells. The structures of synthesized peptides are supported by physico-chemical methods.

Key words: peptides, adamantane, solid-phase synthesis, antiviral activity, computer calculation of biological activity.

Paper received 20/I/2010.

Paper accepted 20/I/2010.

³Purygin Peter Petrovich (Purygin2002@mail.ru), Sribnaya Olesya Sergeevna (elektromodel@mail.ru), Stepanov Evgene Alexandrovich (samarec@list.ru), Danilin Andrey Alexandrovich (zver_nauki@mail.ru), Dept. of Organic, Bioorganic and Medical Chemistry Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁴Buryak Alexey Konstantinovich (AKBuryak@ipc.rcci.ru), the laboratory of physico-chemical foundations of chromatography and chromatography-mass spectrometry, Institute of Physical chemistry and electrochemistry A.N. Frumkin by name, Moscow, 119991, Russia.