

Бесплатно

На правах рукописи

МОСКАЛЕНКО Юлия Евгеньевна

**N-АМИДИНО-АМИНОКИСЛОТЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В
СИНТЕЗЕ ПОЛИПЕПТИДОВ**

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Автореферат отпечатан в ИВС РАН. Ризография.

Тираж 100 экз.

С-Петербург – 2008 год

Работа выполнена в Институте высокомолекулярных соединений РАН.

Научные руководители:

член-корреспондент РАН, профессор Евгений Фёдорович Панарин,
кандидат химических наук Сергей Владимирович Буров

Официальные оппоненты:

доктор химических наук Татьяна Борисовна Тенникова
кандидат химических наук Мария Павловна Смирнова

Ведущая организация:

Кафедра высокомолекулярных соединений химического факультета
Санкт-Петербургского государственного университета

Защита состоится «22» мая 2008 г. в 10 часов на заседании

Диссертационного совета Д 002.229.01 при Институте высокомолекулярных
соединений РАН по адресу:

199004, Санкт-Петербург, В.О., Большой пр., д.31, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института высокомолекулярных
соединений РАН.

Автореферат диссертации разослан «10» апреля 2008 г.

Учёный секретарь

Диссертационного совета

кандидат физико-математических наук

Долотова Н.А.

2. *Moskalenko Yu., Burov S., Leko M., Dorosh M., Shkarubskaya Z., Panarin E.* N-Amidino-proline derivatives and their application in peptide synthesis // Proc. 29th Eur. Pept. Symp. 2006. P. 482-483.
3. *Буров С.В., Москаленко Ю.Е., Лeko М.В., Дорош М.Ю., Панарин Е.Ф.* Производные N-амидинопролина и их использование в синтезе пептидов классическим и твердофазным методом // Биоорг. Химия. 2006. Т. 32. № 6. С.1-9.
4. *Москаленко Ю.Е., Дементьева И.Н., Кадинская М.И., Буров С.В.* Влияние аналогов RGD-пептидов и низкоинтенсивного светодиодного облучения на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов // Клинико-лабораторный Консилиум. 2007. № 18. С. 37-41.
5. *Москаленко Ю.Е., Буров С.В., Лeko М.В., Дорош М.Ю., Шкарубская З.П., Панарин Е.Ф.* Производные N-амидино-пролина и их использование в пептидном синтезе // III Рос. симпозиум «Белки и пептиды». Сб. тезисов стендовых докладов. 2007. С. 29.

В ходе выполнения настоящего исследования синтезировано двадцать новых химических соединений, включая производные *N*-амидино-аминокислот, олигопептиды и продукты побочных химических реакций, структуры которых подтверждены методами физико-химического анализа.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы синтеза олигопептидов, содержащих *N*-амидино-пролин, *N*-амидино-пироглутаминовую кислоту и 2-имино-1-имидазолидин-уксусную кислоту (циклокреатин), основанные на использовании защищенных производных или реакции гуанидирования на полимерном носителе.
2. Исследование особенностей применения производных *N*-амидино-пролина показывает, что активация карбоксильной группы свободной аминокислоты сопровождается образованием бициклического побочного продукта.
3. В ходе оптимизации методов твердофазного синтеза олигопептидов, содержащих *N*-амидино-аминокислоты, установлено, что предпочтительным вариантом является гуанидирование на полимерном носителе.
4. Впервые разработан метод синтеза пептидов, содержащих *N*-амидино-пироглутаминовую кислоту, основанный на реакции внутримолекулярной циклизации на полимерном носителе. Показано, что такие соединения устойчивы в диапазоне pH 2-7,4, в то время как при pH 9 наблюдается быстрое раскрытие цикла с образованием производных гуанидино-глутаминовой кислоты.
5. Показано, что включение *N*-амидино-аминокислот в последовательность RGD-пептидов путем замены остатка аргинина или присоединения по *N*-концевой аминокислоте повышает устойчивость аналогов к ферментативному расщеплению в плазме крови человека.
6. Разработан способ получения полимеров, содержащих в боковой цепи *N*-амидино-пролин, путём полимеризации активированного эфира N^{δ} -(*N*-амидино-пролил)-орнитина.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Буров С.В., Москаленко Ю.Е., Панарин Е.Ф. Синтез *N*-[N^{δ} -(2,4,6-триметилфенилсульфонил)-карбамидоил]-*L*-пролина // ЖОХ. 2006. Т. 76. № 4. С. 700-702.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Природные полипептиды и белки применяются при диагностике инфекционных заболеваний, разработке лекарственных препаратов и систем адресной доставки биологически активных соединений в клетки-мишени. Однако использование природных соединений в качестве лекарственных препаратов зачастую ограничено из-за широкого спектра действия, недостаточной энзиматической стабильности и невозможности перорального введения. Одним из способов преодоления таких проблем является получение синтетических аналогов, лишенных перечисленных недостатков или создание пептидомиметиков – органических молекул, моделирующих особенности строения активных центров пептидов и белков. При синтезе рассматриваемых соединений широко используются так называемые неприродные аминокислоты. Проведение структурно-функционального анализа позволяет модифицировать первичную структуру пептида или белка таким образом, чтобы способствовать образованию наиболее выгодной для биологического эффекта конформации.

Таким образом, получение новых аминокислот и разработка методов их введения в полипептидную цепь представляется **актуальной задачей**.

Среди неприродных аминокислот особую роль играют соединения, содержащие гуанидиновую группу, поскольку она входит в состав многих биологически активных веществ: антибиотиков, ингибиторов ферментов, алкалоидов и т. п. Уникальность физико-химических свойств гуанидинов, заключающаяся в сохранении положительного заряда при физиологическом значении pH, обуславливает их важную роль во многих биологических процессах. В современной литературе представлены многочисленные методы, используемые при синтезе замещенных гуанидинов. Вместе с тем, их практическое применение не всегда приводит к положительным результатам, что свидетельствует о необходимости оптимизации способов получения конкретных объектов. Для моделирования ключевых особенностей *N*-концевой последовательности аргинил-пролин, входящей в состав многих природных пептидов, нами был выбран *N*-амидино-пролин и его аналоги: *N*-амидино-пироглутаминовая кислота и 2-имино-1-имидазолидин-уксусная кислота (циклокреатин).

Цель работы. Целью данного исследования является разработка методов синтеза *N*-амидино-аминокислот и их защищенных производных для получения на их основе биологически активных пептидов, пептидомиметиков и полимеров медицинского назначения.

При этом были поставлены следующие **задачи**:

1. Синтезировать *N*-амидино-пролин и его производные, защищённые по амидиновой группе;

2. Разработать методы синтеза пептидов, содержащих *N*-амидино-пролин, 2-имино-1-имидазолидин-уксусную кислоту (циклокреатин) и *N*-амидино-пироглутаминовую кислоту;

3. На примере аналогов люлиберина и RGD-пептидов изучить особенности применения *N*-амидино-аминокислот в пептидном синтезе и исследовать их влияние на строение и свойства полученных соединений;

4. Разработать методы синтеза полимеров на основе *N*-амидино-пролина.

Методы исследования. Для подтверждения индивидуальности и доказательства химической структуры синтезированных соединений использовали методы электрофореза, тонкослойной хроматографии, обращённо-фазовой ВЭЖХ, масс-спектрометрии (ESI MS) и спектроскопии ЯМР. Пространственное строение полученных олигопептидов изучали методом двумерной корреляционной спектроскопии ЯМР.

Объектами исследования являлись *N*-амидино-аминокислоты, их защищённые производные, а также полученные при их использовании пептиды и полимеры.

Особенности применения *N*-амидино-аминокислот в классическом и твердофазном пептидном синтезе определены на примере аналогов люлиберина и RGD-пептидов. Возможности получения гуанидин-содержащих полимеров исследованы при проведении полимеризации *N*^δ-(*N*-амидино-пролил)-орнитина.

Научная новизна:

- разработаны методы синтеза олигопептидов, содержащих *N*-амидино-пролин, основанные на использовании мезитиленсульфонильного производного или проведении реакции гуанидирования на полимерном носителе;

- выявлено образование бициклического побочного продукта при активации карбоксильной группы свободного *N*-амидино-пролина;

- разработан способ получения пептидов, содержащих *N*-амидино-пироглутаминовую кислоту, и получены данные об особенностях их поведения в растворе при различных pH;

- предложен простой и эффективный метод синтеза олигопептидов, содержащих 2-имино-1-имидазолидин-уксусную кислоту (циклокреатин);

- установлено, что замена аргинина на *N*-амидино-пролин приводит к значительному повышению устойчивости RGD-пептидов к энзиматическому расщеплению;

- проведен синтез двадцати новых химических соединений, включая производные *N*-амидино-аминокислот, олигопептиды и продукты побочных химических реакций, структуры которых подтверждены методами физико-химического анализа.

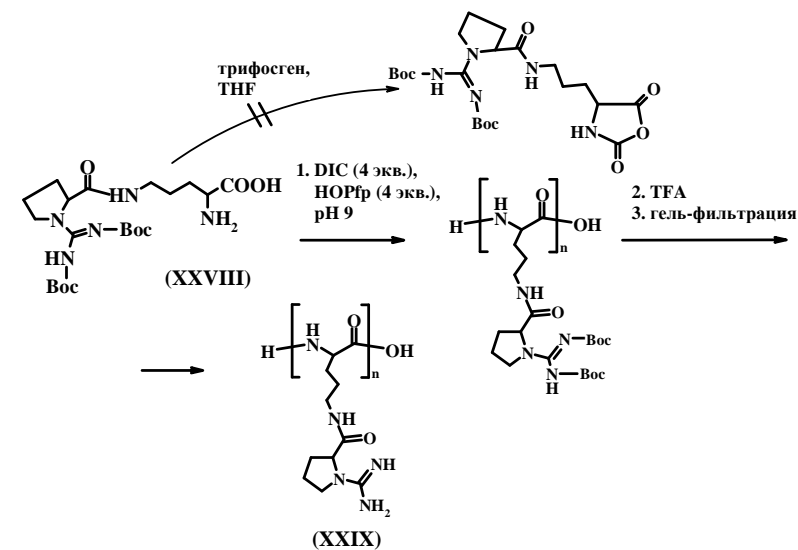


Рис. 15. Схема синтеза поли[*N*^δ-(*N*-амидино-пролил)-орнитина].

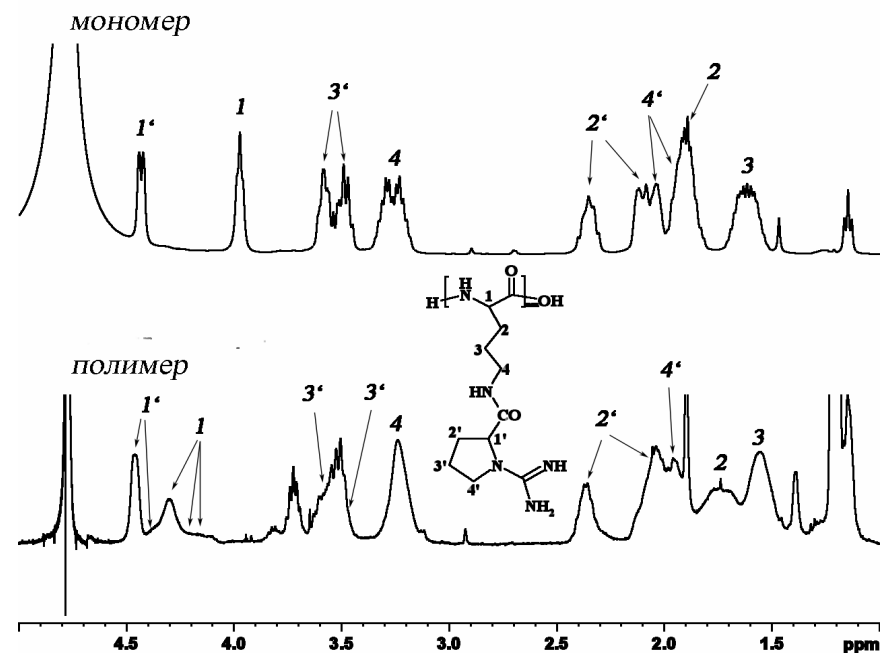


Рис. 16. Сопоставление ¹H-ЯМР спектров *N*^δ-(*N*-амидино-пролил)-орнитина и полимера (XXIX).

Анализ катионных полимеров методом гель-фильтрации*		
Полимер	ММ	Константа распределения
Поли-L-орнитин	41 000	1.17
Гистон (тип VIII-S)	14 300	1.23
Поли-L-гистидин	10 300	1.14
Поли[<i>N</i> ^δ -(<i>N</i> -амидино-пролил)-орнитин] (XXIX)	около 2 500**	1.14

* Условия: сефадекс G-75, колонка 8 x 600 мм, буфер 0.1 н. Na₂SO₄, скорость потока 0.5 мл/мин;

** по данным ЯМР.

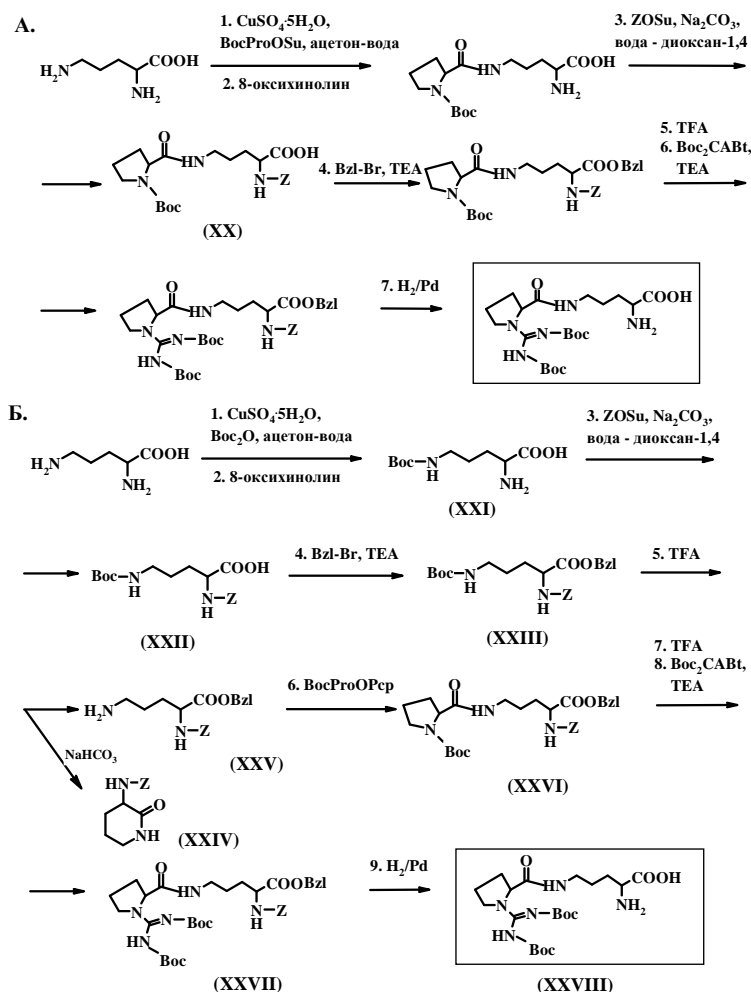


Рис. 14. Схема синтеза мономера (XXVIII).

Практическая значимость работы. Разработанные методы синтеза *N*-амидино-аминокислот и их защищённых производных могут быть использованы при получении биологически активных полипептидов, пептидомиметиков и полимеров, содержащих *N*-амидино-пролин, циклокреатин и *N*-амидино-пироглутаминовую кислоту. На основе последовательности RGDF, модифицированной циклокреатином, синтезирован высокоактивный аналог, перспективный при разработке систем направленной доставки противоопухолевых препаратов.

Положения, выносимые на защиту:

- при получении олигопептидов, содержащих *N*-амидино-пролин, наиболее эффективным является метод гуанидилрования на полимерном носителе;
- замена аргинина на *N*-амидино-пролин позволяет значительно повысить устойчивость аналогов RGD-пептидов к энзиматическому расщеплению;
- проведение реакции внутримолекулярной циклизации является предпочтительным вариантом при синтезе пептидов, содержащих *N*-амидино-пироглутаминовую кислоту.

Апробация работы и публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи. Результаты исследований докладывались на 29-м Европейском пептидном симпозиуме (Гданьск, 2006), III российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Пушино, 2007) и конкурсе молодых ученых ИВС РАН (2006).

Работа выполнена в ИВС РАН в Лаборатории синтеза пептидов и полимерных микросфер в соответствии с планом научно-исследовательских работ по теме: «Биологически активные полимерные системы: синтез, структура, свойства».

Личный вклад автора состоял в проведении экспериментальных работ по синтезу производных *N*-амидино-аминокислот и исследованию особенностей получения пептидов и полимеров на основе таких соединений.

Структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 140 страницах, содержит 4 таблицы, 56 рисунков и 11 приложений, список литературы включает 165 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выбор объектов исследования

N-амидино-пролин, *N*-амидино-пироглутаминовая кислота и 2-имино-1-имидазолидин-уксусная кислота (циклокреатин), моделирующие основные структурные элементы

последовательности аргинил-пролин (рис.1), могут рассматриваться как аналоги аргинина, в которых конформационная подвижность гуанидиновой группы ограничена за счет включения одного или двух атомов азота в пятичленный цикл.

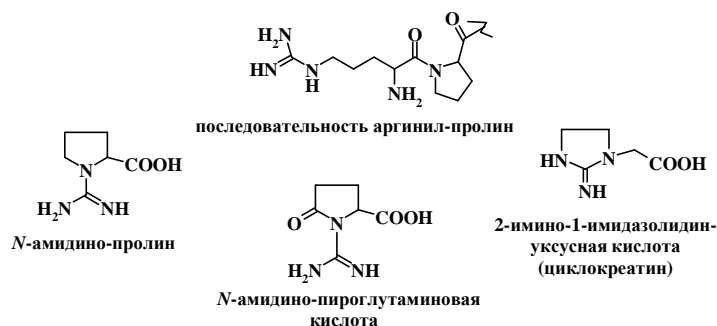


Рис.1. Непептидные аминокислоты, включающие основные структурные элементы последовательности аргинил-пролин.

Непосредственное использование *N*-амидино-аминокислот в пептидном синтезе представляет определенные трудности. Во-первых, вследствие высокой гидрофильности они нерастворимы в обычно применяемых при этом органических растворителях. Во-вторых, такие соединения способны участвовать в ряде побочных реакций, включающих отщепление амидиновой группы, внутримолекулярную циклизацию и ацилирование. Поэтому прежде всего было необходимо разработать простые и надежные методы получения защищенных производных *N*-амидино-аминокислот.

1. *N*-Амидино-пролин

1.1. Синтез защищённых производных *N*-амидино-пролина

На первом этапе работы нами были исследованы два варианта получения производных *N*-амидино-пролина: 1) из незащищенного *N*-амидино-пролина и 2) путем гуанидирования пролина с помощью реагентов, несущих мезитилсульфонильную (Mts) защитную группу (рис. 2).

N-амидино-пролин (**I**) может быть получен в результате взаимодействия цианамида и пролина при кипячении в водно-спиртовой среде (рис. 2). Защита высокоосновной функциональной группы *N*-амидино-пролина путем протонирования при использовании *para*-толуолсульфокислоты позволяет разрешить проблему растворимости исходного соединения в органических растворителях. В то же время, попытка проведения реакции

мономера из свободного орнитина требует меньших затрат времени, однако из-за сложности выделения промежуточного соединения (**XX**) выход целевого продукта невысок (рис. 14а). Поэтому в дальнейшем синтез проводили с использованием защищённого производного орнитина (рис. 14б). При этом было обнаружено, что отщепление *Woc*-защиты с последующей обработкой в щелочной среде сопровождается циклизацией с образованием 3-бензилоксикарбониламино-2-пиперидона (**XXIV**), (рис. 14б). Следует отметить, что, несмотря на образование энергетически выгодного шестичленного цикла, высокая реакционная способность достаточно стабильного бензильного эфира является неожиданной. Тем не менее, предложенная схема синтеза (рис. 14б) обеспечивает хороший выход целевого продукта и может использоваться при получении мономеров, содержащих *N*-амидино-пролин.

Попытки синтеза полимера методом полимеризации *N*-карбоксиянгидридов (рис. 15) оказались безрезультатными по причине низкой растворимости мономера в стандартных условиях реакции получения *N*-карбоксиянгидрида. В связи с этим при проведении полимеризации был использован метод активированных эфиров, полученных *in situ* (рис. 15).

По данным гель-фильтрации на сефадексе G-75 объём элюции для синтезированного соединения соответствует выходу поликатионных молекул, использованных в качестве репера. Вместе с тем, несмотря на применение буфера с ионной силой, равной 0,5, наблюдается эффект удерживания из-за электростатического взаимодействия положительно заряженных групп полимера и остаточных карбоксильных групп сефадекса, что приводит к совпадению времени выхода полимеров с широким диапазоном масс (табл. 3).

Структурный анализ синтезированного соединения методом масс-спектрометрии в нашем случае также не дал однозначного ответа вследствие возможной фрагментации полимера в эксперименте. Поэтому для определения содержания концевых групп был привлечен другой структурный метод – спектроскопия ЯМР (рис. 16). Это позволило оценить степень полимеризации полученного полипептида, равную 10, что соответствует молекулярной массе около 2500. Определённое значение молекулярной массы хорошо коррелирует с ее оценочной величиной, рассчитанной по данным масс-спектрометрического анализа.

Таким образом, на примере поликонденсации *N*⁵-(*N*-амидино-пролил)-орнитина впервые показано, что при получении полимеров, содержащих *N*-амидино-пролин, наиболее предпочтительным является метод активированных эфиров.

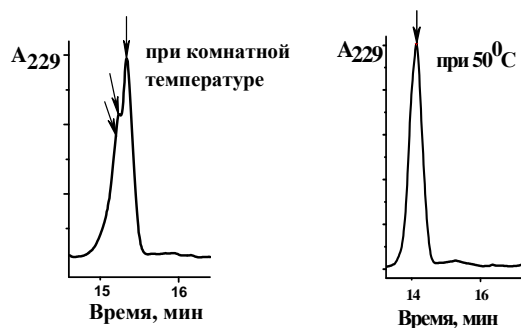


Рис. 12. Анализ аналога (XVIII) методом ОФ ВЭЖХ. Слева – при комнатной температуре, справа – при 50°C.

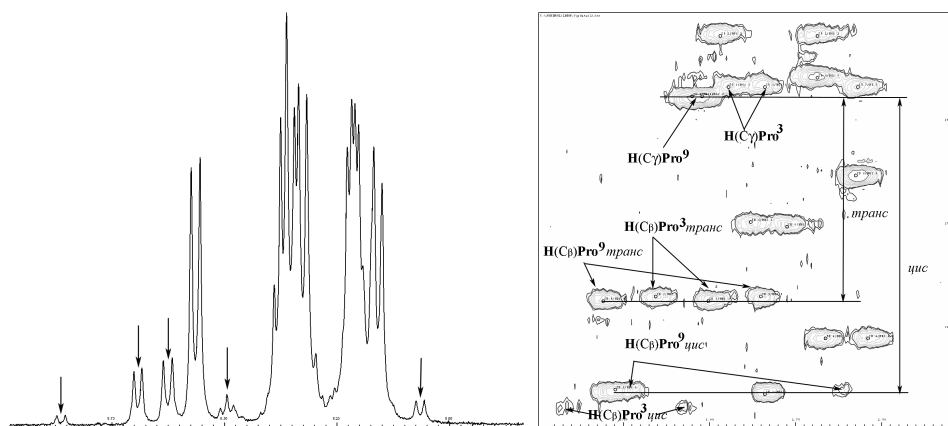


Рис. 13. Фрагменты спектров ЯМР аналога люлиберина (XVIII): слева – область амидных протонов в ^1H -спектре (стрелками отмечены сигналы минорных (*цис*) конформеров); справа – корреляционный (^1H - ^{13}C)-ЯМР спектр, различия в химических сдвигах протонов при C_β -углеродных атомах для *цис*- и *транс*-конформеров пролина.

этом представляет интерес как изучение влияния пространственной структуры боковой цепи на физико-химические свойства соответствующих полимеров, так и возможностей их практического использования в качестве антимикробных агентов или носителей биологически активных веществ.

Для синтеза поли- α -аминокислот широко используется метод полимеризации *N*-карбоксиангидридов, получаемых в результате взаимодействия α -аминокислот с фосгеном. В случае *N*-амидино-пролина применение этого метода невозможно из-за отсутствия α -аминогруппы, поэтому в качестве мономера был выбран дипептид *N*⁵-(бис-трет-бутилоксикарбонил-*N*-амидино-пролил)-орнитин ((XXVIII), рис. 14). Для предотвращения побочных реакций амидиновую группу блокировали с помощью Вос-защиты. Получение

конденсации с помощью *N,N'*-диизопропилкарбодимида (DIC) в присутствии 1-гидроксибензотриазола (HOBT) приводит к практически количественному образованию побочного продукта. Аналогичный результат наблюдается в ходе получения трифторацетильного производного действием на соединение (I) смеси трифторуксусного ангидрида и трифторуксусной кислоты. Исследование структуры полученного соединения с помощью масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР позволяет сделать вывод о наличии побочной реакции циклизации *N*-амидино-пролина, приводящей к образованию выгодного пятичленного цикла (структура II, рис. 2).

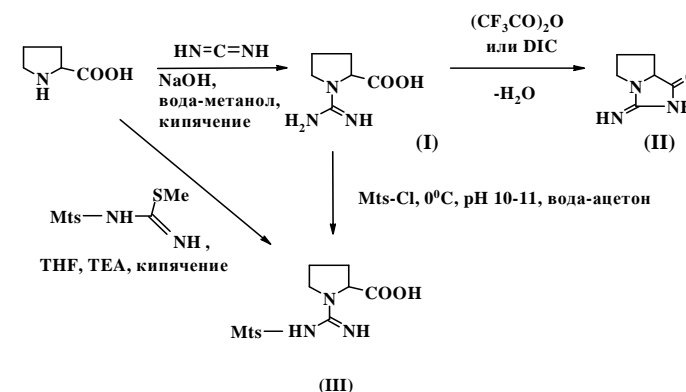


Рис. 2. Получение *N*-амидино-пролина и его производного.

Ввиду нестабильности исходного соединения (I) в присутствии водоотнимающих агентов, мы исследовали возможность получения его защищенных производных путём гуанидирования пролина. В качестве защитной была выбрана Mts-группа, широко используемая в твердофазном пептидном синтезе для блокирования гуанидиновой функции аргинина. Из литературы известен ряд методик гуанидирования с применением защищенных тиомочевин, в т.ч. сульфанильных производных *S*-метилтиоизоомочевины. Аналогичная схема была использована нами для получения Mts-*N*-амидино-пролина (рис. 2). Поскольку необходимым условием реакции гуанидирования является кипячение в основной среде, что может приводить к частичной рацемизации, для количественной оценки оптической чистоты конечного продукта (III) были синтезированы диастереомерные пары *L*- и *D*-*N*-амидино-пролил-*L*-аланин. Синтез дипептидов в растворе карбодимидным методом проходит не менее чем за сутки, что может быть связано со стерическими препятствиями. Анализ полученных продуктов методом ОФ ВЭЖХ (рис. 3) показывает, что схема синтеза, описанная в литературе, не позволяет получить оптически чистое производное (содержание

D-изомера более 3%). Поэтому в ходе дальнейшей работы была исследована возможность блокирования амидиновой группы путем обработки *N*-амидино-пролина мезитиленсульфонилхлоридом. Реакция протекает в смеси ацетон-вода (0°C, pH 10-11) и позволяет синтезировать соединение (III) (рис. 2) без потери оптической чистоты и с удовлетворительным выходом. Полученное производное может быть использовано при синтезе пептидов классическим и твердофазным методами.

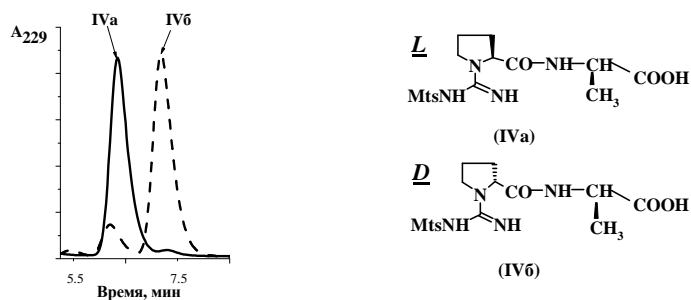


Рис. 3. Разделение диастереомерных пар методом ОФ ВЭЖХ.

1.2. Твердофазный синтез пептидов, содержащих *N*-амидино-пролин

В настоящее время синтез на полимерном носителе является наиболее широко распространенным и эффективным методом получения биологически активных полипептидов. Нами были исследованы два варианта твердофазного синтеза пептидов, содержащих *N*-амидино-пролин: 1 – применение защищенных производных *N*-амидино-пролина и 2 – введение амидиновой группы в процессе гуанидирования *N*-концевого пролина на полимерном носителе (рис. 4).

Особенности применения *Mts-N*-амидино-пролина в твердофазном пептидном синтезе исследовали на примере получения аналога аргинил-глицил-аспартил-фенилаланина (RGDF). Нами показано, что присоединение *Mts-N*-амидино-пролина карбодимидным методом (рис. 4), как и в классическом синтезе, вследствие стерических препятствий протекает с трудом и требует увеличения продолжительности реакции конденсации до 24 ч (по сравнению с 1-2 ч в случае стандартного протокола) или применения более эффективных, чем DIC, агентов. Поэтому на следующем этапе работы мы исследовали возможности непосредственного введения гуанидиновой группы в пептидную последовательность, ковалентно связанную с полимерным носителем. В этом случае использовали более кислотолабильную *трет*-бутилоксикарбонильную (Boc) защитную группу. Анализ современных литературных данных

Синтез пептидов проводили твердофазным методом. Для введения в структуру аналогов *N*-амидино-пролина использовали два различных подхода. Присоединение *Mts-N*-амидино-пролина карбодимидным методом приводило к образованию лишь незначительного количества целевого продукта, несмотря на увеличение продолжительности реакции. В то же время, гуанидирование *N*-концевого остатка пролина под действием (*N,N'*-бис-*трет*-бутилоксикарбонил)-1*H*-карбоксаимидин-бензотриазола проходило с высокой эффективностью. В этом случае по данным изотинового теста реакция завершается за 18 ч и позволяет получить пептиды с достаточно высоким выходом. Таким образом, гуанидирование на полимерном носителе является предпочтительным методом синтеза олигопептидных последовательностей, содержащих *N*-амидино-пролин.

Известно, что пептидная связь преимущественно принимает *транс*-конформацию, однако для имидной связи с участием пролина характерна *цис-транс*-изомерия (рис. 11), и определение влияния остатков пролина на соотношение образующихся конформеров представляет интерес, поскольку это может влиять на биологическую активность синтезируемых пептидов. Следует отметить, что для аналогов люлиберина, содержащих *N*-концевой *N*-амидино-пролин, характерна изомеризация пептидной связи, образуемой остатками пролина в положениях 3 и 9 аминокислотной последовательности. Содержание *цис*-форм Pro³ и Pro⁹ по интенсивности соответствующих сигналов в ¹H-ЯМР спектре составляет 17% и 5% соответственно. Стабильность образующихся конформеров подтверждается данными ОФ ВЭЖХ (рис. 12) и спектроскопии ЯМР (рис. 13).

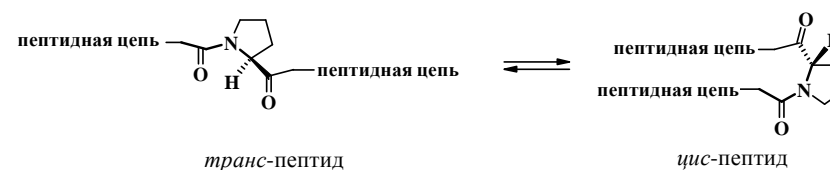


Рис. 11. Изомеризация пептидной связи, образованной пролином.

4.3. Использование производных *N*-амидино-пролина при синтезе полимеров

Разработка методов синтеза полимеров, содержащих *N*-амидино-пролин, представляет важную задачу, поскольку такие соединения могут рассматриваться в качестве аналогов полиаргинина с ограниченной конформационной подвижностью гуанидиновой группы. При

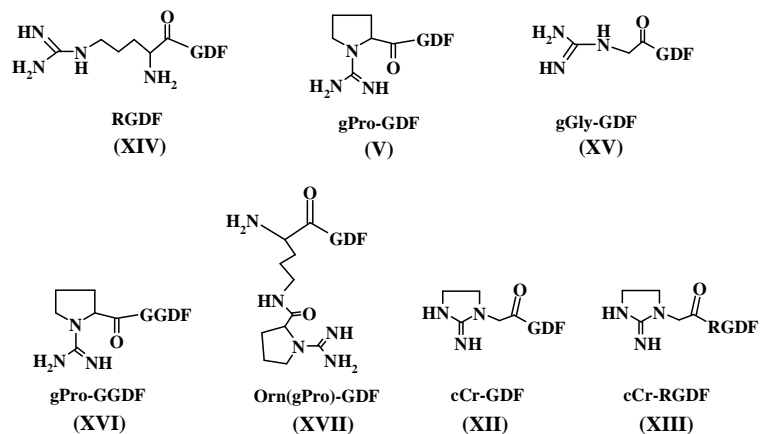


Рис. 9. Структуры синтезированных аналогов пептида RGDF (XIV).

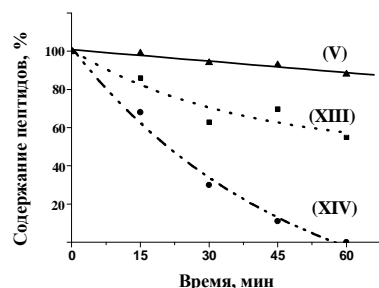


Рис. 10. Исследование стабильности пептидов в плазме крови человека.

Таблица 2

Исследование влияния RGD-пептидов на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов крови человека

Соединение	IC ₅₀	
	10 ⁻³ моль/л (доверительный интервал, p < 0.05)	мкг/мл
(XIV)	2,0·10 ⁻² (1,7·10 ⁻² ; 2,5·10 ⁻²)	10
(V)	1,09 (0,87; 1,34)	518
(XV)	1,93 (1,78; 2,09)	842
(XVI)	2,97 (2,38; 3,61)	1563
(XVII)	3,76 (1,03; 6,54)	1734
(XII)	1,05 (0,40; 1,80)	392
(XIII)	4,38·10 ⁻³ (6,62·10 ⁻⁴ ; 2,90·10 ⁻²)	3

указывает на два наиболее перспективных варианта гуанидирования аминов: 1. – действие *N,N'*-бис-*трет*-бутилоксикарбонил-тиомочевины в сочетании с реагентом Мукаямы и 2. – применение (*N,N'*-бис-*трет*-бутилоксикарбонил)-1*H*-карбоксамидин-бензотриазола (рис. 4).

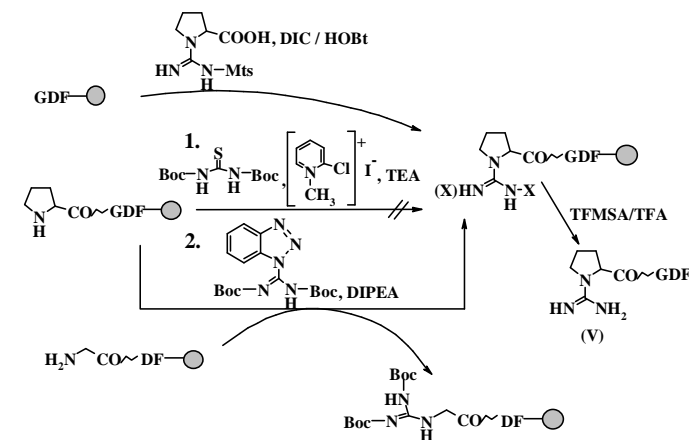
Рис. 4. Твердофазный синтез пептидов, содержащих *N*-амидино-аминокислоты (X – защитная группа).

Таблица 1

Сравнительная эффективность гуанидирования первичной и вторичной аминогруппы пептидил-полимера под действием (*N,N'*-бис-*трет*-бутилоксикарбонил)-1*H*-карбоксамидин-бензотриазола

X-GDF	Избыток гуанидилирующей смеси	Время реакции, ч	Выход модифицированного пептида, %*
X = Gly	3	2	22
X = Gly	3	4	57*
X = Pro	3	19	54*

* Приведен выход продукта, очищенного с помощью ВЭЖХ.

** По данным нингидринового и изатинового тестов реакция проходит на 100%.

Поскольку в первом случае вместо целевого пептида образуется продукт взаимодействия с реагентом Мукаямы неуставленной структуры, то для модификации пептидов, содержащих как вторичную, так и первичную аминогруппу был использован метод гуанидирования (*N,N'*-бис-*трет*-бутилоксикарбонил)-1*H*-карбоксамидин-бензотриазолом в присутствии *N,N*-диизопропилэтиламина (DIPEA). В этом случае реакция проходит с высоким выходом и без каких-либо осложнений. Следует отметить, что при прочих равных условиях (избыток реагента, природа и количество основания) первичная аминогруппа глицина модифицируется в течение 2-4 ч, в то время как имино-группа пролина за 12-19 ч (табл. 1).

Таким образом, проведенное исследование показывает, что гуанидильрование на полимерном носителе является предпочтительным методом при твердофазном синтезе коротких пептидов, содержащих *N*-амидино-пролин. В то же время при проведении классического синтеза в растворе, представляется целесообразным использовать защищенные производные *N*-амидино-пролина.

2. *N*-Амидино-пироглутаминовая кислота

Пироглутаминовая кислота, представляющая собой пятичленный лактам глутаминовой кислоты, входит в состав ряда белков и пептидных гормонов. Производные пироглутаминовой кислоты запатентованы как препараты для лечения дерматологических, вирусных и опухолевых заболеваний. Биологическая значимость пироглутаминовой кислоты, структурное сходство с пролином и возможность использования при синтезе лекарственных препаратов обуславливают интерес к получению её неприродных аналогов. При исследовании принципиальной возможности получения *N*-амидино-пироглутаминовой кислоты нами были рассмотрены следующие варианты: гуанидильрование эфира пироглутаминовой кислоты, окисление *N*-амидино-пролина и внутримолекулярная циклизация гуанидино-глутаминовой кислоты с образованием лактама (рис. 5).

Из литературы известно, что реакция ацилирования пироглутаминовой кислоты проходит с большим трудом вследствие делокализации неподеленной электронной пары азота при участии соседней карбонильной группы. Вместе с тем, описан синтез ряда *N*-ацильных и *N*-алкильных производных при использовании в качестве катализаторов *N,N*-диметиламинопиридина (DMAP), гидрида натрия и др. В нашем случае оказалось, что применение (*N,N'*-бис-трет-бутилоксикарбонил)-1*H*-карбоксамидин-бензотриазола для проведения реакции гуанидильрования в аналогичных условиях не позволяет получить целевого продукта (метод 1, рис. 5). По-видимому, в данном случае пониженная реакционная способность пироглутаминовой кислоты усугубляется наличием стерических препятствий, создаваемых защитными группами.

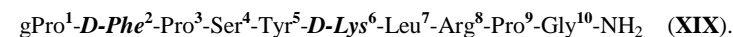
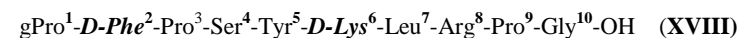
Альтернативный вариант, основанный на окислении *N*-амидино-пролина, приводит к образованию сложной смеси веществ, содержащей незначительное количество целевого соединения (метод 2, рис. 5). Поэтому в ходе дальнейшей работы мы исследовали схему внутримолекулярной циклизации гуанидино-глутаминовой кислоты (метод 3, рис. 5).

В качестве исходного соединения при проведении модификаций был выбран пептид, соответствующий последовательности (95-98) α -цепи фибриногена (RGDF), который по литературным данным обладает высокой антиагрегантной активностью. В ходе работы нами синтезировано 6 аналогов, при получении которых *N*-концевой остаток аргинина заменяли близкими по структуре неприродными аминокислотами, содержащими гуанидиновую группу, или присоединяли их по *N*-концевой аминогруппе (рис. 9). Результаты сравнительного изучения устойчивости полученных соединений при инкубации в плазме крови человека представлены на рис. 10. Методом ОФ ВЭЖХ показано, что содержание пептида с *N*-амидино-пролином остается практически неизменным в течение часа, количество аналога, модифицированного циклокреатином, уменьшается примерно на 40%, а природная последовательность RGDF расщепляется полностью (рис. 10). Высокая стабильность аналога (XIII) свидетельствует о перспективности его применения при разработке методов доставки циклокреатина в опухолевые клетки. На следующем этапе работы в С-Петербургском Государственном Медицинском Университете им. ак. Павлова было исследовано влияние синтезированных аналогов на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*. По данным биологических испытаний замена аргинина на неприродные аминокислоты оказывает существенное влияние на антиагрегантную активность пептидов (табл. 2). Полученные результаты могут быть использованы при поиске эффективных ингибиторов агрегации тромбоцитов на основе фрагментов α -цепи фибриногена.

4.2. Синтез аналогов люлиберина

Возможности применения *N*-амидино-пролина при синтезе более длинных олигопептидных последовательностей были исследованы нами на примере аналогов люлиберина. Люлиберин является пептидным гормоном, оказывающим влияние на репродуктивную функцию организма, а его аналоги широко используются при лечении эндокринных и опухолевых заболеваний.

Для определения влияния природы *N*-концевого аминокислотного остатка на конформацию аналогов и оценки возможности стабилизации β -изгиба за счёт ионного взаимодействия концевых группировок нами были получены соединения (XVIII) и (XIX):



Особенности применения циклокреатина в пептидном синтезе были исследованы нами на примере аналогов пептида RGDF (XII) и (XIII) (рис. 8). При этом оказалось, что реакция ацилирования сопровождается образованием побочных продуктов неустановленной структуры ((XIIa) и (XIIIa)).

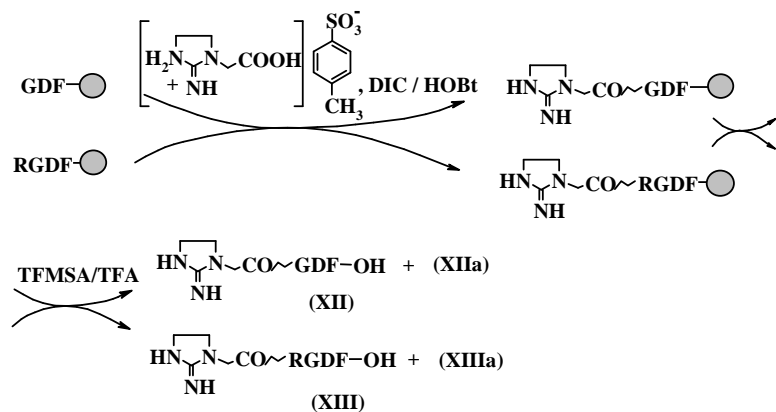


Рис. 8. Схема получения соединений (XII) и (XIII), модифицированных циклокреатином.

Несмотря на образование некоторого количества побочных продуктов, их отделение не представляет трудности благодаря существенному отличию во времени удерживания в условиях проведения ОФ ВЭЖХ. Таким образом, нами предложен оригинальный и простой метод введения циклокреатина в последовательность коротких олигопептидов, содержащих 5-10 аминокислотных остатков.

4. Синтез пептидов, содержащих *N*-амидино-аминокислоты

4.1. Получение аналогов RGD-пептидов

Возможность практического использования *N*-амидино-аминокислот была исследована нами, в первую очередь, на примере синтеза аналогов RGD-пептидов. Эти короткоцепочечные пептиды с достаточно простой структурой обладают способностью связываться с интегринными белками наружной оболочки клетки – и могут быть использованы для подавления тромбообразования, в качестве противоопухолевых агентов и при разработке систем адресной доставки лекарственных препаратов. Вместе с тем, из литературы известно, что применение некоторых RGD-пептидов в медицинских целях ограничено вследствие быстрого расщепления связи аргинин – глицин под действием ряда ферментов (трипсин, тромбин, фактор коагуляции Ха и кластрипаин).

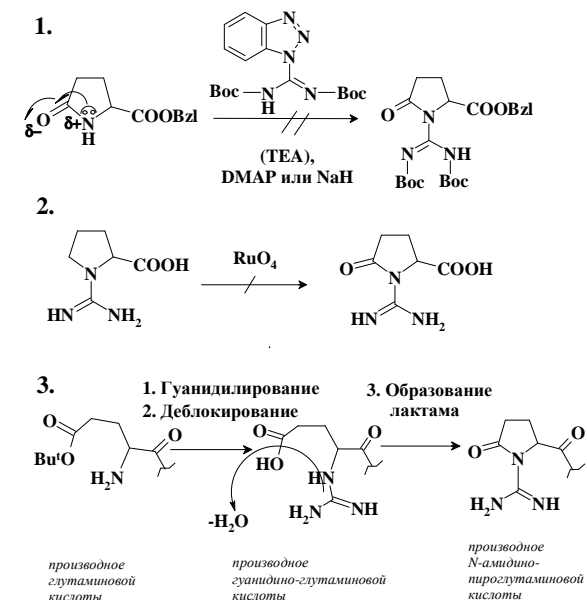


Рис. 5. Схемы синтеза *N*-амидино-пироглутаминовой кислоты.

С целью повышения эффективности реакции и упрощения процедуры выделения конечного продукта нами был использован метод твердофазного синтеза. На примере модельного дипептида были отработаны условия циклизации гуанидино-глутаминовой кислоты. Однако применение жёстких условий для отщепления пептида от полимерного носителя (действие трифторметансульфокислоты) осложняло очистку конечного продукта, а использование этиламина приводило к раскрытию лактама с образованием этиламида. Поэтому в дальнейшем синтез проводили на полимере Ванга, позволяющем отщеплять пептид в мягких условиях под действием трифторуксусной кислоты (рис. 6). Несмотря на то, что обычно полимерные носители этого типа применяют в сочетании со щелочнолабильными защитными группировками, недавно был предложен метод селективного удаления *Boc*-защиты, происходящего без расщепления связи пептид – полимер, под действием раствора триметилсилил-трифлата в присутствии основания. Интересно отметить, что реакция деблокирования сопровождается образованием побочного продукта, о котором не упоминают авторы публикации. Данные масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР показывают, что это соединение представляет собой продукт алкилирования триэтиламина фрагментом линкерной группы полимерного носителя ((X), рис. 6).

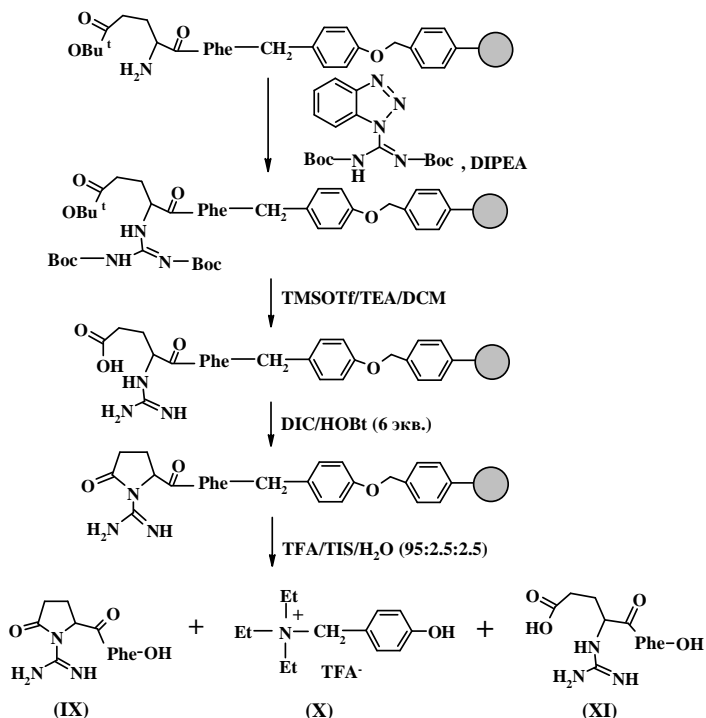


Рис. 6. Синтез *N*-амидино-пироглутамил-фенилаланина (IX) на полимере Ванга.

Следует отметить, что в реакционной смеси наряду с пептидом (IX), содержащим *N*-амидино-пироглутаминовую кислоту, остается 10-15% нециклического предшественника (XI) (рис. 7а), количество которого не меняется при увеличении продолжительности реакции или применении более эффективных конденсирующих агентов. При этом показано, что очистка целевого продукта значительно упрощается при проведении хроматографического разделения в формиатном буфере за счёт различного удерживания молекул с ионизированными COOH-группами (рис. 7б).

Исследование, проведенное методом ОФ ВЭЖХ, показывает, что в водном растворе пептид (IX) устойчив в кислой, нейтральной и слабощелочной средах, а при pH 9 полностью превращается в соединение (XI).

Предложенный метод синтеза может быть использован для введения *N*-амидино-пироглутаминовой кислоты в последовательность коротких пептидов, содержащих не более 6-7 аминокислотных остатков. Применение аналогичной схемы для синтеза аналогов люлиберина, включающих десять аминокислотных остатков, не привело к положительным

результатам. Поэтому при получении олигопептидных последовательностей, содержащих *N*-амидино-пироглутаминовую кислоту, представляется целесообразным использовать метод фрагментной конденсации.

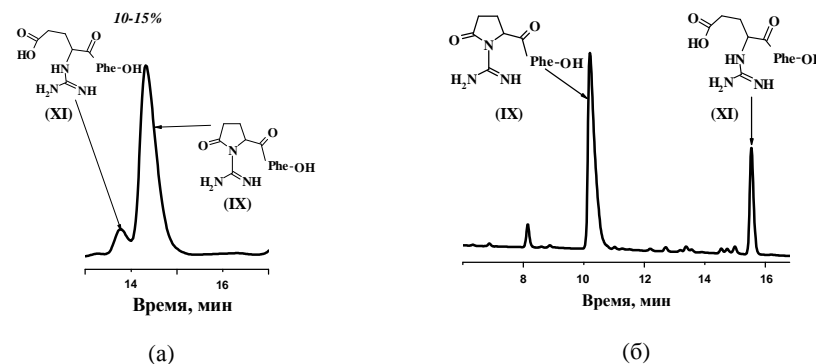


Рис. 7. Разделение соединений (IX) и (XI) методом ОФ ВЭЖХ в трифторацетатном буфере при pH 2 (а) и формиате аммония при pH 6 (б).

3. 2-имино-1-имидазолидин уксусная кислота (циклокреатин)

2-имино-1-имидазолидин-уксусная кислота (циклокреатин), близкая по структуре к другим объектам исследования – *N*-амидино-пролину и *N*-амидино-пироглутаминовой кислоте, является аналогом креатина – вещества, поддерживающего энергетический баланс в клетках живых организмов. Циклокреатин, напротив, вызывает нарушения в энергетическом обмене, что позволяет использовать его для лечения вирусных и онкологических заболеваний. При этом для доставки циклокреатина в клетки-мишени могут быть использованы синтетические полипептиды, что обуславливает интерес к разработке методов его включения в аминокислотную последовательность. Нам не удалось обнаружить литературных данных относительно использования циклокреатина при синтезе пептидов и пептидомиметиков, вместе с тем, описано применение его производных, которые предложены в качестве аналогов аргинина.

При проведении пептидного синтеза для улучшения растворимости в органических растворителях и подавления побочных реакций ацилирования необходимо использовать защищенное производное циклокреатина. Простейшим вариантом является защита протонированием при использовании *para*-толуолсульфокислоты. Полученный *para*-толуолсульфонат обладает хорошей растворимостью в диметилформамиде, что делает возможным его использование при проведении конденсации карбодимидным методом.