



УДК 577.112.343

Вос/Vzl-ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДА ДЕЛЬТОРФИНА II И ЕГО АНАЛОГОВ БЕЗ ПРИМЕНЕНИЯ БЕЗВОДНОГО ФТОРИСТОГО ВОДОРОДА

© 2024 г. В. Н. Азев^{*,#}, Л. Г. Мустаева^{*}, Е. Ю. Горбунова^{*}, Л. К. Байдакова^{*},
А. Н. Чулин^{*}, Л. Н. Маслов^{**}, А. В. Мухомедзянов^{**},
М. В. Молчанов^{***}, А. И. Мирошников^{****}

* Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

** НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, Россия, 634012 Томск, ул. Киевская, 111-А

*** Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Россия, 142290 Пущино, ул. Институтская, 3

**** Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия,
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 10.02.2024 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 22.02.2024 г.

Токсичность безводного фтористого водорода – ключевой фактор поиска альтернативных кислот Льюиса для проведения процессов глобального удаления защитных групп и снятия пептидов с полимерной подложки на последней стадии их Вос/Vzl-синтеза. В отличие от фтористого водорода, эти кислоты – высококипящие соединения, но благоприятные физико-химические свойства большинства пептидов позволяют отделить целевой продукт от избытка кислот посредством метода переосаждения. Мы обнаружили, что этот метод не применим для синтеза образцов пептида дельторфина II и его аналогов, в связи с чем были исследованы иные способы их выделения и очистки. В результате были разработаны альтернативные методы синтеза, выделения и эффективной очистки пептидов класса дельторфина II. Новые подходы могут найти применение в синтезе других гидрофобных пептидов.

Ключевые слова: Вос/Vzl-методология, дельторфин II, кислота Льюиса, твердофазный синтез пептидов

DOI: 10.31857/S0132342324050089, **EDN:** LQWVAU

ВВЕДЕНИЕ

Пептид дельторфин II (H-Tyr-(D)-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂) – высокоселективный агонист δ-опиоидного рецептора (δ-OP) [1]. Модуляторы опиоидных рецепторов проявляют биологическую активность не только в отношении ЦНС: в частности, в последнее время активно исследовалась кардиопротекторная активность

агонистов и антагонистов опиоидных рецепторов [2, 3], включая δ-OP [4].

Кардиопротекторный эффект дельторфина II изучен мало, хотя была продемонстрирована значительная инфаркт-лимитирующая активность этого пептида [5, 6], кроме того, проводились исследования, направленные на установление молекулярного механизма этой активности [7].

Сокращения: PhSMe – тиоанизол; TBTU – 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия тетрафторборат; TFMSA – трифторметансульфокислота; TMSBr – триметилсилилбромид; TMSOTf – триметилсилилтрифлат; δ-OP – δ-опиоидный рецептор.

Автор для связи: (тел.: +7 (4967) 73-54-42; эл. почта: viatcheslav.azev@bibch.ru).

Совокупность полученных данных позволила нам сделать вывод о перспективности продолжения работ по изучению кардиопротекторных свойств дельторфина II и его аналогов, что, в свою очередь, требовало разработки эффективных методов их химического синтеза.

Некоторые аналоги дельторфина II синтезировали в растворе по блочной схеме, в которой сборка целевых пептидов происходила с активацией трипептида, содержащего фенилаланин на C-конце [8]. Авторы не оценивали степень протекания побочной реакции рацемизации хирального центра фенилаланина, хотя известно, что на модельных пептидах такое осложнение протекает в значительной степени [9].

Описаны Fmoc/^tBu-твердофазные синтезы дельторфина II и различных его аналогов. При применении этого подхода в общем случае могут образовываться побочные продукты удвоения аминокислот [10], а в одном из конкретных литературных примеров практической реализации этого метода для синтеза аналогов дельторфина II были описаны трудности в образовании амидных связей между остатками валинов и Glu-Val [11].

Boc/Bzl-методология твердофазного пептидного синтеза лишена этих недостатков, однако в ее практической реализации в классическом варианте применяется безводный фтористый водород – реагент для глобального деблокирования и снятия целевых соединений с полимерной подложки [12]. Это токсичный реагент, и, кроме того, для проведения экспериментальной работы с его использованием требуется специальное оборудование из фторуглеродных материалов [13]. Тем не менее в практике Boc/Bzl-методологии твердофазного пептидного синтеза используются другие кислоты Льюиса для осуществления тех же химических превращений, в том числе для синтеза C-концевых амидных форм пептидов: растворы триметилсилибромида [14], триметилсилилтрифлата [15] и трифторметансульфо кислоты [16] в трифторуксусной кислоте в присутствии тиоанизола и других нуклеофильных добавок.

Целью данной работы был поиск альтернативного эффективного метода химического синтеза пептида дельторфина II (**I**) и его аналогов с использованием Boc/Bzl-методологии без применения безводного фтористого водорода. Помимо пептида (**I**) объектами исследования были следующие его аналоги: соединения H-Tyr-D-Ala-Phe(4-NO₂)-Glu-Val-Val-Gly-NH₂ (**II**), H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Ser-NH₂ (**III**) и H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-D-Ala-NH₂ (**IV**).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используя в начале всей работы пептид (**I**) в качестве модельного соединения, изучали возможность применения ускоренного протокола пошагового наращивания пептидной цепи, в котором стадия конденсации оксисбензотриазолилового эфира аминокислоты с аминокислотной группой пептидил-полимера требует 10–20 мин [17]. Однако на стадии образования связи Val⁵-Val⁶ результаты качественного теста Кайзера [18] однозначно свидетельствовали о низкой конверсии реакции ацилирования в этих условиях, вероятно, из-за неблагоприятного стерического взаимодействия двух изопропильных групп. Тем не менее при использовании обычных условий осуществления синтеза по Boc/Bzl-методологии [19] (первая конденсация 2–3 ч, повторная до 18 ч) наращивание пептидной цепи проходило без осложнений в случае всех синтезируемых объектов.

Неожиданный результат был получен на последних стадиях синтеза целевых соединений – деблокирования и снятия с подложки – при попытке выделения пептида (**I**) и его аналогов с использованием стандартного метода пересадки. В данном методе раствор TFMSA и продуктов реакции в TFA добавляют к диэтиловому эфиру, при этом с той или иной скоростью образуется осадок, обогащенный пептидом, а избыток кислот находится в растворе. Именно таким образом выделяли, например, синтетическую рибонуклеазу А [20], и тот же метод использовали в работе, посвященной систематическому поиску условий снятия пептидов с полимерной подложки с использованием TFMSA [16]. Наконец, ранее мы аналогичным образом успешно выделяли другие пептиды [21].

При использовании указанного метода образование осадка пептида (**I**) не наблюдалось, и, насколько нам известно, такие прецеденты в литературе не описаны. Попытки разбавления раствора каким-либо еще малополярным растворителем или смена растворителя для пересадки были непродуктивны. Поскольку избыток сильных кислот мог привести к протеканию побочных реакций в растворе пептида (**I**), другим очевидным решением была нейтрализация кислот с использованием третичных аминов. Из ряда опробованных оснований только добавление пиридина привело к образованию кристаллической массы, содержащей пептид (тест Кайзера с аликвотой осадка) в количестве ~1 масс. %.

Нам не удалось разделить пептид (**I**) и соли с использованием диализа, поскольку все имею-

щиеся у нас мембраны, по-видимому, разрушались избытком органических солей. Пробное разделение смеси пептида (I) и солей пиридина проводили с применением гель-фильтрации на сорбенте Sephadex G-10 (метод 1). Такой стандартный подход себя не оправдал: по результатам нингидринового теста и масс-спектрометрического анализа во фракциях А и В (рис. 1а) находился целевой пептид, при этом основная по массе фракция А содержала значительное количество солей.

Однако мы обратили внимание на существенную разницу в массах нанесенной смеси (суммарно 1.5 г) и выделенных фракций (756 мг фракции А и 8 мг фракции В). Вероятно, значительное количество солей переходило в газовую фазу во время упаривания фракций и лиофилизации остатков после упаривания. Из литературы известно, например, что некоторые соли соединений азота настолько летучи, что могут использоваться как компоненты элюентов в ВЭЖХ-МС [22, 23].

В одном из последующих экспериментов (метод 2) по выделению смесь пептида (I) и его солей (также 1.5 г) многократно упаривали с большим объемом воды и лиофилизировали. Остаток (~270 мг) разделяли на сорбенте G-10 (рис. 1б). Такой способ разделения целевого соединения и солей имел уже некоторый успех, потому что фракция А содержала в основном пептид (I), а фракция В – по-прежнему смесь пептида (I) и

трифлата пиридиния. Последний был выделен из фракции В с помощью ВЭЖХ.

С целью повышения эффективности процесса разделения анализировали возможность применения иных сорбентов. В литературе описан эксперимент по фракционированию сложной смеси соединений пептидной природы на сорбенте Sephadex LH-20 [24]. Авторы отмечают, что время удерживания пептидов зависело от числа ароматических аминокислотных остатков, вероятно, вследствие адсорбционного механизма разделения. Соли пиридина содержат один относительно гидрофобный ароматический остаток, а целевые соединения – два, и, кроме того, они содержат гидрофобные остатки аминокислоты валина. Таким образом, применение сорбента Sephadex LH-20 имело перспективы.

Действительно, при использовании этого сорбента распределение пептида во фракциях оказалось совершенно иным (метод 3). Фракция А (рис. 1в) не содержала пептид, но, в то же время, он распределился по фракциям В и С. Кроме того, порядок выхода элюатов (первыми соли, а затем пептид) свидетельствовал об адсорбционном механизме разделения соединений. Фракции В и С подвергали разделению методом ВЭЖХ, при этом выход пептида (I) оказался гораздо выше (56% против 24% по методу 2).

Исследовали также возможность проведения лиофилизации солей с водяным паром (вместо упаривания) с последующей очисткой уже на сорбенте Sephadex LH-20 (метод 4). В этом

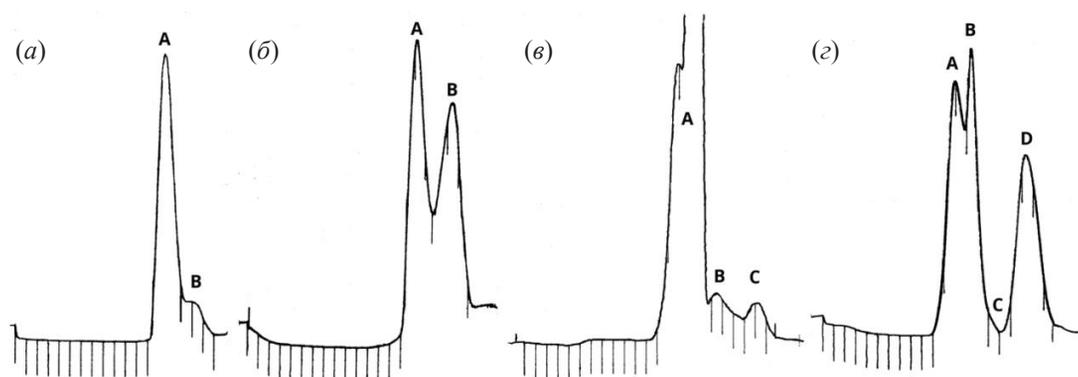


Рис. 1. Хроматограммы стадий процесса гель-фильтрации смеси пептида (I) и низкомолекулярных примесей, вертикальные линии соответствуют промежутку времени 2 мин. (а) – Сорбент Sephadex G-10, отсутствие разделения при нанесении необработанной смеси; (б) – Sephadex G-10, частичное разделение после отгонки значительной части солей с водяным паром перед нанесением; (в) – сорбент Sephadex LH-20, частичное разделение при нанесении необработанной смеси; (г) – сорбент Sephadex LH-20, практически полное разделение после отгонки значительной части солей с водяным паром в ходе лиофилизации перед нанесением.

эксперименте из 1.5 г смеси после лиофилизации получили ~230 мг остатка: соотношение в целом похоже на результат с использованием метода 2. Разделение полученного лиофилизата оказалось еще более продуктивным: целевой пептид содержался в одной фракции D (рис. 1з), которая уже явно отделялась от примесей солей. Выход пептида (I) после препаративной ВЭЖХ-очистки оказался несколько более высоким, чем полученный при использовании метода 3.

В настоящее время мы не можем отдать предпочтение методу 3 или методу 4. Затраты по времени на лиофилизацию большого объема воды и на прямое разделение смеси с большей массой одинаковые (упаривание еще большего объема воды, как в методе 2, приводит к существенным временным затратам). Следует также принимать во внимание коррозионные свойства солей пиридина при проведении лиофилизации. В то же время в методе 4 целевой продукт элюировался одним пиком. С использованием метода 4 нам удалось выделить остальные объекты исследования, поскольку ни один из них также не осаждался из диэтилового эфира после стадии глобального деблокирования. Соединения (I–IV) очищали методом ВЭЖХ и тщательно характеризовали спектральными методами.

Следует отметить факт стабильности нитрогруппы в условиях ацидолиза (1 М PhSMe, 1 М TFMSA в TFA). Хотя пептиды, содержащие 4-нитрофенилаланин, были успешно синтезированы при использовании безводного фтористого водорода [25], применяемый нами реагент значительно отличается по своей химической природе, но является сильной кислотой. В то же время в сильноокислой среде известны прецеденты миграции нитрогруппы при нитровании ароматических соединений [26], а в некоторых случаях было показано, что реакция нитрования ароматических соединений может быть обратима [27]. Кроме того, существуют методы восстановления нитрогруппы в ароматических соединениях с использованием неорганических сульфидов в присутствии кислот Льюиса [28, 29], а в нашем случае восстановителем мог быть тиоанизол. Таким образом, стабильность нитрогруппы в условиях ацидолиза *a priori* не была однозначной. Тем не менее, несмотря на наши опасения, основным продуктом, судя по данным ЯМР-спектроскопии (наличие *n*-замещенной ароматической системы, содержащей сильный электроноакцепторный заместитель), было целевое соединение (II).

Применение TFMSA оказалось довольно трудоемким процессом. В одном из пробных экспериментов по использованию другой кислоты Льюиса (TMSOTf) [15] была получена смесь пептида (I) и другого соединения, которое, судя по данным масс-спектрометрического анализа (m/z 784.3851), представляло собой, по-видимому, *S*-концевую кислотную форму пептида (I). Дальнейшие эксперименты с использованием TMSOTf не проводились. В то же время TMSBr [14] в наших руках оказался неэффективен в снятии пептида (I) с полимерной подложки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все растворители, гидроксид калия, безводный хлорид кальция – коммерчески доступные продукты (Реахим и Химмед, Россия). В работе использовали стандартные производные аминокислот (IRIS Bitech GmbH, Германия); Boc-Phe(4-NO₂)-OH, *m*-крезол, тиоанизол (Fluka, Швейцария), трифторметансульфокислоту (Chemical Line, Россия), трифторуксусную кислоту (P&M Invest, Россия). В работе с трифторметансульфокислотой шлифы всех стеклянных приборов смазывали фторуглеродной смазкой Томфлон ПЭФ 300 (ООО “Фторполимерные технологии”, Россия). Очищенную воду (18 МОм) получали на установке Milli-Q (Millipore, США).

Спектры ЯМР регистрировали на приборе Avance III (BioSpin, Bruker, Германия) (¹H при 600 МГц, ¹³C при 125 МГц) и калибровали по сигналам остаточных протонов дейтерированного растворителя DMSO-*d*₆. Химические сдвиги приведены в миллионных долях, а КССВ – в герцах. Сигналы в ¹H-ЯМР-спектрах относили с использованием данных 2D-ЯМР-экспериментов (COSY, HSQC, HMBC). Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе Orbitrap Elite Hybrid Ion Trap-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Германия).

Аналитическую ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа Waters (Waters Corporation, США), оборудованного насосом модели 1525 и детектором 2487, на колонке Phenomenex (Phenomenex, США) Luna 5u C18 (0.46 × 25 см) с детекцией на двух длинах волн (226 и 280 нм), объемный расход элюента 1 мл/мин. Элюент А – вода (0.1%-ная TFA), элюент В – ацетонитрил. Параметры градиента: 0–1 мин – 5% В; 1–20 мин – 5–80% В; 20–21 мин – 80–5% В; 21–25 мин – 5% В.

Общие условия осуществления химического синтеза пептидил-полимеров. Синтез проводили с использованием MBHA-полимера с начальной загрузкой аминогрупп 1.2 ммоль/г (0.45 ммоль)

и стандартных защищенных производных аминокислот: Вос-Тур(2-BrZ)-ОН, Вос-Glu(OBzl)-ОН и Вос-Ser(Bzl)-ОН. Операции промывок и деблокирования временной N_α -Вос-защитной группы проводили по известным методикам [19], а активацию производных аминокислот – с помощью TBTU [30]. Конверсию реакций ацилирования аминогрупп оценивали с использованием качественного теста Кайзера [18].

Общие условия осуществления стадии деблокирования и снятия пептида с подложки. Пептидил-полимер (0.45 ммоль) суспендировали при медленном перемешивании в смеси тиоанизола (1.4 мл) и *m*-крезола (0.58 мл) в одnogорлой колбе, снабженной стеклянным краном (колбе Шленка), внешний штуцер которого укупорен резиновой пробкой (септой). Спустя 10 мин добавляли 100%-ную TFA (8.7 мл), подсоединяли хлоркальциевую трубку ($CaCl_2$), содержимое колбы охлаждали в ледяной бане в течение 10 мин. К содержимому колбы с помощью стеклянного шприца, снабженного иглой из нержавеющей стали, добавляли TFMSA (0.94 мл) через септу. Кран закрывали, содержимое колбы перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и фильтровали в диэтиловый эфир (100 мл). Пептидил-полимер на фильтре промывали TFA (3×0.5 мл). К колбе с эфирным раствором подсоединяли капельную воронку с противодавлением, снабженную хлоркальциевой трубкой ($CaCl_2$), в которую добавляли пиридин (15.2 мл). Колбу охлаждали на ледяной бане, смесь кислот нейтрализовывали пиридином при перемешивании. Содержимое колбы нагревали до комнатной температуры и фильтровали. Осадок на фильтре промывали диэтиловым эфиром (3×50 мл). Полученную смесь солей и пептида сушили в вакуум-эксикаторе над КОН в течение 48 ч. Масса смеси после высушивания составила 30.2–30.5 г, теоретическое содержание пептида 0.35–0.38 г (~1 масс. %).

Общие условия проведения процесса гель-фильтрации. Хроматографическое разделение проводили с использованием системы LKB Bromma (LKB, Швеция), состоящей из перистальтического насоса модели 2115, колонки 26×400 мм (высота слоя сорбента 320 мм), детектора серии 2158 (детекция на длине волны 226 нм), коллектора фракций модели 2211 и самописца модели 2210. Элюирование проводили в изократическом режиме с использованием 0.1 М водной АсОН с последующей промывкой колонки 1 М водной АсОН. Объемный расход элюента 3 мл/мин, объем фракции 6 мл.

Общие условия анионного обмена. Пептид растворяли в очищенной воде и выдерживали с избытком (20 экв.) анионообменной смолы IRA-400 (хлоридная форма) в течение 15 мин. Раствор фильтровали, промывали смолу очищенной водой (3×2 мл), после чего раствор лиофилизировали.

Разделение пептида (I) и солей пиридиния.
Метод 1. Смесь солей и пептида (1.5 г) порциями по 100 мг растворяли в 0.1 М АсОН (1.5 мл), наносили на колонку гель-фильтрации и хроматографировали в соответствии с общими условиями на сорбенте Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция). После упаривания и лиофилизации получили 756 мг фракции А и 8 мг фракции В (рис. 1а). Ввиду значительного содержания солей во фракции А дальнейшую очистку методом ВЭЖХ не проводили.

Метод 2. Смесь солей и пептида (1.5 г) растворяли в 300 мл очищенной воды и упаривали досуха на ротационном испарителе. Процесс повторяли 10 раз. Остаток после упаривания лиофилизировали. Полученную смесь (268 мг) порциями по 35–45 мг растворяли в 0.1 М АсОН (1.5 мл), наносили на колонку гель-фильтрации и хроматографировали в соответствии с общими условиями на сорбенте Sephadex G-10. После упаривания и лиофилизации получили 4.1 мг фракции А и 38.3 мг фракции В (рис. 1б). Из обеих фракций по отдельности выделяли целевой пептид методом препаративной ВЭЖХ (28%-ный водный MeCN, 0.1%-ная TFA). После анионного обмена выход пептида (I) составил 4.3 мг (24% на все стадии).

Метод 3. Смесь солей и пептида (1.5 г) порциями по 100 мг растворяли в 0.1 М АсОН (1.5 мл), наносили на колонку гель-фильтрации и хроматографировали в соответствии с общими условиями на сорбенте Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция). После упаривания и лиофилизации получили 11.5 мг фракции В и 23.2 мг фракции С (рис. 1в). Из обеих фракций по отдельности выделяли целевой пептид методом препаративной ВЭЖХ (28%-ный водный MeCN, 0.1%-ная TFA). После анионного обмена выход пептида (I) составил 10.1 мг (56% на все стадии).

Метод 4. Смесь солей и пептида (1.5 г) растворяли в 400 мл очищенной воды и лиофилизировали в течение 36 ч. Остаток перерастворяли в 100 мл очищенной воды и лиофилизировали в течение 18 ч. Полученную смесь (227 мг) порциями по 30 мг растворяли в 0.1 М АсОН (1.5 мл), наносили на колонку гель-фильтрации и хроматографировали в соответствии с общими условиями на сорбенте Sephadex LH-20. После

упаривания и лиофилизации получили 69 мг фракции D (рис. 1з), из которой выделяли целевой пептид методом препаративной ВЭЖХ (28%-ный водный MeCN, 0.1%-ная TFA). После анионного обмена выход пептида (I) составил 11.2 мг (62% на все стадии).

H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂ гидрохлорид (I). Суммарный выход 210 мг (57%). Время удерживания 14.45 мин. Спектр ¹H-ЯМР (298 К): 0.71 (д, *J* 6.96, 1H, ala²CH₃β), 0.79–0.88 (м, 12H, Val⁵CH₃γ и Val⁶CH₃γ), 1.79 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.83–2.01 (м, 3H, Glu⁴CH₂β Val⁵CH₃β и Val⁶CH₃β), 2.24 (м, 2H, Glu⁴CH₂γ), 2.66 (дд, *J* 11.22, 13.50, 1H, Phe³CH₂β), 2.82 (м, 2H, Tyr¹CH₂β), 3.03 (дд, *J* 3.24, 13.74, 1H, Phe³CH₂β), 3.59 (дд, *J* 5.58, 16.74, 1H, Gly⁷CH₂α), 3.66 (дд, *J* 6.01, 16.71, 1H, Gly⁷CH₂α), 3.98 (м, 1H, Tyr¹CHα), 4.11 (ψт, *J* 7.38, 1H, Val⁶CHα), 4.24 (дд, *J* 7.08, 8.46, 1H, Val⁵CHα), 4.31 (м, 1H, Glu⁴CHα), 4.36 (м, 1H, ala²CHα), 4.59 (ддд, *J* 3.42, 8.48, 11.21, 1H, Phe³CHα), 6.67 (д, *J* 8.52, 2H, Tyr¹Ar), 6.99 (д, *J* 8.51, 2H, Tyr¹Ar), 7.01 (уш. с, 1H, Gly⁷NH₂), 7.11–7.31 (м, 6H, Phe³Ar и Gly⁷NH₂), 7.79 (д, *J* 8.76, 1H, Val⁵NHα), 7.95 (д, *J* 8.28, 1H, Val⁶NHα), 8.05 (уш. с, 3H, Tyr¹NH₃⁺α), 8.08 (ψт, *J* 5.71, 1H, Gly⁷NHα), 8.32–8.39 (м, 3H, ala²NHα, Phe³NHα и Glu⁴NHα), 9.31 (с, 1H, Tyr¹OH), 12.13 (уш. с, 1H, Glu⁴CO₂Hγ). Спектр ¹³C-ЯМР (298 К): 171.17, 171.09, 170.97, 170.79, 170.61, 167.20, 156.47, 137.69, 130.46, 129.25, 127.85, 126.22, 124.69, 115.16, 58.03, 57.40, 53.34, 53.30, 51.92, 47.73, 41.70, 37.93, 36.36, 30.52, 30.14, 27.29, 19.18, 19.11, 18.81, 18.19, 18.00. HRMS (+ESI) *m/z*: найдено *M* 783.3979; вычислено для C₃₈H₅₅N₈O₁₀⁺, [*M* + H]⁺ 783.403.

H-Tyr-D-Ala-Phe(4-NO₂)-Glu-Val-Val-Gly-NH₂ гидрохлорид (II). Суммарный выход 214 мг (55%). Время удерживания 15.26 мин. Спектр ¹H-ЯМР (298 К): 0.78–0.88 (м, 12H, Val⁵CH₃γ и Val⁶CH₃γ), 0.71 (д, *J* 7.02, 1H, ala²CH₃β), 1.78 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.83 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.96 (м, 1H, Val⁶CH₃β), 1.97 (м, 1H, Val⁵CH₃β), 2.06–2.22 (м, 2H, Glu⁴CH₂γ), 2.55 (дд, *J* 7.98, 13.50, 1H, Tyr¹CH₂β), 2.80 (дд, *J* 5.94, 13.58, 1H, Tyr¹CH₂β), 2.89 (дд, *J* 10.08, 13.50, 1H, Phe(4-NO₂)³CH₂β), 3.17 (дд, *J* 3.66, 13.56, 1H, Phe(4-NO₂)³CH₂β), 3.53 (м, 1H, Tyr¹CHα), 3.59 (дд, *J* 5.58, 16.74, 1H, Gly⁷CH₂α), 3.66 (дд, *J* 6.01, 16.72, 1H, Gly⁷CH₂α), 4.09 (ψт, *J* 7.50, 1H, Val⁶CHα), 4.17–4.26 (м, 3H, ala²CHα, Glu⁴CHα и Val⁵CHα), 4.63 (ддд, *J* 3.96, 9.42, 9.97, 1H, Phe(4-NO₂)³CHα), 6.65 (д, *J* 8.46, 2H, Tyr¹Ar), 6.99 (д, *J* 8.50, 2H, Tyr¹Ar), 7.02 (уш. с, 1H, Gly⁷NH₂), 7.18 (уш. с, 1H, Gly⁷NH₂), 7.49 (д, *J* 8.70, 2H, Phe(4-NO₂)³Ar), 7.81 (д, *J* 8.70, 1H, Val⁵NHα), 7.89 (д, *J* 8.16, 1H,

Val⁶NHα), 8.06–8.16 (м, 3H, Phe(4-NO₂)³Ar и Gly⁷NHα), 8.22 (д, *J* 8.46, 1H, Phe(4-NO₂)³NHα), 8.26 (д, *J* 6.42, 1H, ala²NHα), 8.63 (д, *J* 6.65, 1H, Glu⁴NHα), 9.30 (уш. с, 1H, Tyr¹OH). Спектр ¹³C-ЯМР (298 К): 174.60, 172.34, 171.79, 170.91, 170.85, 170.51, 170.16, 155.77, 146.16, 145.93, 130.50, 129.99, 127.61, 122.87, 114.90, 58.09, 57.55, 55.44, 52.99, 52.63, 47.89, 41.71, 37.18, 30.85, 30.23, 29.97, 27.08, 19.06, 19.00, 18.08, 17.90. HRMS (+ESI) *m/z*: найдено *M* 828.3820; вычислено для C₃₈H₅₄N₉O₁₂⁺, [*M* + H]⁺ 828.3886.

H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Ser-NH₂ гидрохлорид (III). Суммарный выход 214 мг (56%). Время удерживания 14.42 мин. Спектр ¹H-ЯМР (298 К): 0.71 (д, *J* 6.96, 1H, ala²CH₃β), 0.79–0.89 (м, 12H, Val⁵CH₃γ и Val⁶CH₃γ), 1.76 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.88 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.89–2.05 (м, 2H, Val⁵CH₃β и Val⁶CH₃β), 2.23 (м, 2H, Glu⁴CH₂γ), 2.66 (дд, *J* 11.40, 13.74, 1H, Phe³CH₂β), 2.81 (м, 2H, Tyr¹CH₂β), 3.03 (дд, *J* 3.30, 13.74, 1H, Phe³CH₂β), 3.50 (дд, *J* 5.52, 10.68, 1H, Ser⁷CH₂β), 3.56 (дд, *J* 5.52, 10.62, 1H, Ser⁷CH₂β), 3.95 (ψт, *J* 7.26, 1H, Tyr¹CHα), 4.17–4.23 (м, 2H, Val⁶CHα и Ser⁷CH₂α), 4.25 (дд, *J* 7.08, 10.92, 1H, Val⁵CHα), 4.31 (м, 1H, Glu⁴CHα), 4.35 (м, 1H, ala²CHα), 4.59 (ддд, *J* 3.41, 8.47, 11.12, 1H, Phe³CHα), 4.82 (уш. с, 1H, Ser⁷OH), 6.67 (д, *J* 8.52, 2H, Tyr¹Ar), 6.98 (д, *J* 8.51, 2H, Tyr¹Ar), 7.06 (уш. с, 1H, Ser⁷NH₂), 7.15–7.28 (м, 6H, Phe³Ar и Ser⁷NH₂), 7.74 (д, *J* 7.92, 1H, Ser⁷NHα), 7.80 (д, *J* 8.77, 1H, Val⁵NHα), 7.94 (д, *J* 8.70, 1H, Val⁶NHα), 8.32–8.40 (м, 3H, ala²NHα, Phe³NHα и Glu⁴NHα), 9.30 (с, 1H, Tyr¹OH), 12.14 (уш. с, 1H, Glu⁴CO₂Hγ). Спектр ¹³C-ЯМР (298 К): 173.92, 171.68, 171.17, 171.10, 170.87, 170.80, 170.50, 167.31, 156.45, 137.69, 130.45, 129.24, 127.85, 126.21, 124.75, 115.15, 61.64, 57.72, 57.44, 54.75, 53.34, 51.94, 47.73, 37.91, 36.41, 30.51, 30.28, 30.14, 27.27, 19.21, 19.13, 18.81, 17.99, 17.90. HRMS (+ESI) *m/z*: найдено *M* 813.4073; вычислено для C₃₉H₅₇N₈O₁₁⁺, [*M* + H]⁺ 813.4141.

H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-D-Ala-NH₂ гидрохлорид (IV). Суммарный выход 225 мг (60%). Время удерживания 15.36 мин. Спектр ¹H-ЯМР (298 К): 0.78–0.91 (м, 15H, ala²CH₃β и Val⁵CH₃γ и Val⁶CH₃γ), 1.18 (д, *J* 7.14, 1H, ala⁷CH₃β), 1.77 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.85 (м, 1H, Glu⁴CH₂β), 1.91–2.01 (м, 2H, Val⁵CH₃β и Val⁶CH₃β), 2.17 (м, 2H, Glu⁴CH₂γ), 2.53 (м, 1H, Tyr¹CH₂β), 2.72 (дд, *J* 10.80, 13.68, 1H, Phe³CH₂β), 2.81 (дд, *J* 5.46, 13.62, 1H, Tyr¹CH₂β), 3.06 (дд, *J* 3.24, 13.68, 1H, Phe³CH₂β), 3.48 (м, 1H, Tyr¹CHα), 4.05 (ψт, *J* 7.62, 1H, Val⁶CHα), 4.15–4.28 (м, 4H, ala²CHα, Glu⁴CHα, Val⁵CHα и ala⁷CHα), 4.51 (м, 1H, Phe³CHα), 6.64 (д, *J* 8.40, 2H, Tyr¹Ar), 6.97 (д, *J* 8.41, 2H, Tyr¹Ar),

6.98 (уш. с, 1H, ala⁷NH₂), 7.12–7.27 (м, 6H, Phe³Ar и ala⁷NH₂), 7.76 (д, *J* 8.64, 1H, Val⁵NHα), 7.93 (д, *J* 8.05, 1H, Val⁶NHα), 8.04 (д, *J* 7.80, 1H, ala⁷NHα), 8.16–8.26 (м, 2H, ala²NHα и Phe³NHα), 8.56 (д, *J* 6.54, 1H, Glu⁴NHα). Спектр ¹³C-ЯМР (298 К): 174.92, 174.03, 172.43, 171.82, 171.10, 171.05, 171.01, 170.36, 155.82, 137.76, 130.13, 129.20, 127.91, 127.79, 126.18, 114.96, 58.39, 57.55, 55.54, 53.71, 52.69, 47.79, 37.34, 31.17, 30.36, 29.90, 27.18, 19.14, 19.03, 18.36, 18.27, 18.14, 18.07. HRMS (+ESI) *m/z*: найдено *M* 797.4127; вычислено для C₃₉H₅₇N₈O₁₀⁺, [*M* + H⁺] 797.4192.

Трифлат пиридиния. Выделен из аликвоты фракции В (метод 2) с использованием препаративной ВЭЖХ. Спектр ¹H-ЯМР (298 К, D₂O-H₂O): 7.99 (шт, *J* 6.97, 2H, PyH-3), 8.54 (тт, *J* 1.35, 7.95, 1H, PyH-4), 8.69 (д, *J* 5.66, 2H, PyH-2). Спектр ¹³C-ЯМР (298 К, D₂O-H₂O): 147.14, 141.17, 127.41, 119.58 (к, *J* 316.84).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При использовании сильных кислот Льюиса в качестве альтернативы безводному фтористому водороду процесс выделения гидрофобных пептидов может иметь трудности при применении стандартного подхода. В качестве альтернативы предложен и успешно опробован на примере пептида дельторфина II и трех его аналогов способ, в котором смесь кислот нейтрализуют пиридином, а полученную смесь солей и целевого пептида хроматографируют на сорбенте LH-20 либо сразу, либо после предварительной лиофилизации избытка солей пиридиния с водяным паром.

Разработанные методы выделения и очистки могут найти применение в выделении других гидрофобных пептидов в случае, когда стандартный способ непродуктивен.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны к.ф.-м.н. А.К. Сурину (Институт белка РАН) за помощь в регистрации масс-спектров высокого разрешения.

Авторы выражают благодарность инженеру А.И. Поляковой (ФИБХ РАН) за осуществление масштабирования процессов разделения пептидов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 23-65-10017). Исследование стабильности 4-нитрофенилаланина в условиях ацидолиза выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ FFEU-2024-0056).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lazarus L.H., Bryant Sh.D., Cooper P.S., Salvadori S. // Prog. Neurobiol. 1999. V. 57. P. 377–420. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00050-1)
2. Headrick J.P., Pepe S., Peart J.N. // Curr. Pharm. Des. 2012. V. 18. P. 6090–6100. <https://doi.org/10.2174/138161212803582360>
3. Rawal H., Patel B.M. // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 2018. V. 23. P. 279–291. <https://doi.org/10.1177/1074248418757009>
4. See Hoe L., Patel H.H., Peart J.N. // Delta Opioid Receptors and Cardioprotection. In: Delta Opioid Receptor Pharmacology and Therapeutic Applications. Handbook of Experimental Pharmacology. V. 247 / Ed. Jutkiewicz E. Cham: Springer, 2018. P. 301–334. https://doi.org/10.1007/164_2017_6
5. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Oeltgen P.R., Barzakh E.I., Krylatov A.V., Govindaswami M., Brown S.A. // Life Sci. 2009. V. 84. P. 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.02.016>
6. Maslov L.N., Mukhomedzyanov A.V., Tsibulnikov S.Y., Suleiman M.-S., Khaliulin I., Oeltgen P.R. // Eur. J. Pharmacol. 2021. V. 907. P. 174302. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174302>
7. Popov S.V., Mukhomedzyanov A.V., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Kurbatov B.K., Prasad N.R., Singh N., Fu F., Azev V.N. // Membranes. 2023. V. 13. P. 63. <https://doi.org/10.3390/membranes13010063>
8. Salvadori S., Bianchi C., Lazarus L.H., Scaranari V., Attila M., Tomatis R. // J. Med. Chem. 1992. V. 35. P. 4651–4657. <https://doi.org/10.1021/jm00103a001>
9. Benoiton N.L., Lee Y.C., Steinaur R., Chen F.M.F. // Int. J. Pept. Protein Res. 1992. V. 40. P. 559–566. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1992.tb00441.x>
10. Yang Y. // Side Reactions in Peptide Synthesis (1st ed.). London: Academic Press, 2015.
11. Guerrini R., Capasso A., Sorrentino L., Anacardio R., Bryant Sh.D., Lazarus L.H., Attila M., Salvadori S. // Eur. J. Pharmacol. 1996. V. 302. P. 37–42. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00067-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00067-2)
12. Sakakibara S., Nakamizo N., Kishida Y., Yoshimura S. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1968. V. 41. P. 1477–1479. <https://doi.org/10.1246/bcsj.41.1477>

13. *Muttenthaler M., Albericio F., Dawson P.E.* // Nat. Protoc. 2015. V. 10. P. 1067–1083.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2015.061>
14. *Hughes J.L., Leopold E.J.* // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. P. 7713–7716.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61546-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61546-0)
15. *Akaji K., Fujii N., Tokunaga F., Miyata T., Iwanaga S., Yajima H.* // Chem. Pharm. Bull. 1989. V. 37. P. 2661–2664.
<https://doi.org/10.1248/cpb.37.2661>
16. *Jubilut G.N., Cilli E.M., Tominaga M., Miranda A., Okada Y., Nakaie C.R.* // Chem. Pharm. Bull. 2001. V. 49. P. 1089–1092.
<https://doi.org/10.1248/cpb.49.1089>
17. *Schnölzer M., Alewood P., Jones A., Alewood D., Kent S.B.H.* // Int. J. Pept. Protein Res. 1992. V. 40. P. 180–193.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1992.tb00291.x>
18. *Kaiser E., Colecott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I.* // Anal. Biochem. 1970. V. 34. P. 595.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90146-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90146-6)
19. *Stewart J.M., Young J.D.* // Solid Phase Peptide Synthesis. Pierce Chemical Company Rockford, IL, 1984.
20. *Yajima H., Fujii N.* // J. Am. Chem. Soc. 1981. V. 103. P. 5867–5871.
<https://doi.org/10.1021/ja00409a040>
21. *Kravchenko S.V., Domnin P.A., Grishin S.Yu., Panfilov A.V., Azev V.N., Mustaeva L.G., Gorbunova E.Yu., Kobayakova M.I., Surin A.K., Glyakina A.V., Fadeev R.S., Ermolaeva S.A., Galzitskaya O.V.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 524.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010524>
22. *Espada A., Rivera-Sagredo A.* // J. Chromatogr. A. 2003. V. 987. P. 211–220.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01819-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01819-8)
23. *Subirats X., Bosch E., Rosés M.* // LCGC North America. 2009. V. 27. P. 1000–1004.
<https://www.chromatographyonline.com/view/buffer-considerations-lc-and-lc-ms>
24. *Göransson U., Luijendijk T., Johansson S., Bohlin L., Claeson P.* // J. Nat. Prod. 1999. V. 62. P. 283–286.
<https://doi.org/10.1021/np9803878>
25. *Barbeau D., Guay S., Neugebauer W., Escher E.* // J. Med. Chem. 1992. V. 35. P. 151–157.
<https://doi.org/10.1021/jm00079a020>
26. *Myhre P.C.* // J. Am. Chem. Soc. 1972. V. 94. P. 7921–7923.
<https://doi.org/10.1021/ja00777a043>
27. *Olah G.A., Narang S.C., Malhotra R., Olah J.A.* // J. Am. Chem. Soc. 1979. V. 101. P. 1805–1807.
<https://doi.org/10.1021/ja00501a028>
28. *Nickson T.E.* // J. Org. Chem. 1986. V. 51. P. 3903–3904.
<https://doi.org/10.1021/jo00370a031>
29. *Shiao M.-J., Lai L.-L., Ku W.-Sh., Lin P.-Y., Hwu J. R.* // J. Org. Chem. 1993. V. 58. P. 4742–4744.
<https://doi.org/10.1021/jo00069a046>
30. *Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillissen D.* // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. P. 1927–1930.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)99616-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)99616-3)

Boc/Bzl Solid Phase Synthesis of Deltorphin II and its Analogues without Utilization of Anhydrous Hydrogen Fluoride

V. N. Azev^{*,#}, L. G. Mustaeva^{*}, E. Yu. Gorbunova^{*}, L. K. Baidakova^{*}, A. N. Chulin^{*}, L. N. Maslov^{}, A. V. Mukhomedziyanov^{**}, M. B. Molchanov^{**}, and A. I. Miroshnikov^{***}**

[#] Phone: +7 (4967) 73-54-42; e-mail: viatcheslav.azev@bibch.ru

^{*} Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Bioorganic Chemistry Institute RAS, prosp. Nauki 6, Puschino, 142290 Russia

^{**} Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS, ul. Kievskaya 111-A, Tomsk, 634012 Russia

^{***} Institute for Theoretical and Experimental Biophysics RAS, ul. Institutskaya 3, Puschino, 142290 Russia

^{****} Shemyakin and Ovchinnikov Bioorganic Chemistry Institute RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

The toxicity and aggressive nature of hydrogen fluoride have resulted in development of alternative strong Lewis acid-based reagents for final deprotection and cleavage steps in Boc/Bzl peptide synthesis. The acids employed are high-boiling liquids unlike hydrogen fluoride, however most peptides could be quite easily isolated from the cleavage cocktails due to their favorable physico-chemical properties: they are usually precipitated with ether. We found that this simple procedure is not suitable for the isolation of Deltorphin II peptides and its analogues. Therefore we developed alternative isolation methods and successfully purified these peptides. The procedures developed could be utilized in purification of other hydrophobic peptides.

Keywords: Boc/Bzl-methodology, Deltorphin II, Lewis acid, solid phase peptide synthesis