



УДК 577.112.6:542.953

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ТВЕРДОФАЗНОГО АВТОМАТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОГО РЕАКТОРА ПЕРЕМЕННОГО ОБЪЕМА

© 1995 г. С. А. Мошников, Л. Г. Мустаева, А. В. Данилов, И. Е. Сухов*, М. Б. Бару
Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино;
* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 16.03.94 г.

Разработан протокол твердофазного синтеза пептидов в автоматических синтезаторах MilliGen/Biosearch 9500 и 9600 со встроенными проточными реакторами переменного объема. Для оптимизации параметров процесса использовались данные свеллографического мониторинга. На модернизированных синтезаторах по разработанному протоколу синтезированы пептиды, содержащие от 10 до 21 аминокислотных остатков. Продемонстрирована значительная экономия используемых в синтезе растворителей и реагентов при удовлетворительном качестве синтезированных пептидов.

Ключевые слова: пептидный синтез; проточный реактор переменного объема; свеллографический мониторинг.

Автоматические синтезаторы в настоящее время широко применяются для получения пептидов твердофазным методом. Подавляющее большинство этих приборов ориентировано на работу с набухающими полистиролдивинилбензольными матрицами. Вследствие постоянного и часто значительного изменения объема пептид-полимера в том или ином растворителе/реагенте на различных стадиях процесса синтеза обычно используют непроточные реакторы периодического действия с рабочим объемом, в несколько раз превышающим объем полимерной матрицы [1 - 7]. На практике протокол синтетического цикла есть не что иное, как многократные промывки полимерного носителя каким-либо растворителем/реагентом, взятым в большом избытке.

Для работы с набухающими полимерными матрицами нами был предложен ПРПО [8], уже получивший применение в ТФСП [9 - 12]. ПРПО

Используемые сокращения: ПРПО – проточный реактор переменного объема, ТФСП – твердофазный синтез пептидов, Asp – ацетоамидометил, Boc – трет-бутилоксикарбонил, ClZ – 2-хлорбензилоксикарбонил, DIC – N,N'-диизопропилкарбодиимид, DMF – диметилформамид, Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил, HOBT – 1-гидроксисбензотриазол, Mtg – 4-метокси-2,3,6-триметилбензилсульфонил, Pfp – пентафторфенил, TFA – трифторуксусная кислота, Tos – *n*-толуолсульфонил, Trt – трифенилметил.

Адрес для переписки: 142292, Пущино Московской обл., микрорайон Д, 5-22, Бару Михаилу Борисовичу.

оснащен системой измерения относительных объемов полимерного носителя в ходе синтеза (свеллографический мониторинг) [9], который облегчает оптимизацию протокола ТФСП с целью повышения его экономичности. Очевидно, что максимального эффекта такая оптимизация может достичь в автоматических системах для ТФСП. С этой целью мы осуществили структурную перестройку серийных автоматических синтезаторов MilliGen/Biosearch 9500 и 9600. Данные модели – достаточно удобный вариант для модернизации, так как в отличие от приборов фирм Applied Biosystems [2 - 3] и Biotronic [5] каждый клапан представляет собой отдельное независимое управляемое устройство. Кроме того, имеющееся программное обеспечение синтезатора позволяет легко изменять его или создавать новые программы управления синтезом.

Модернизация синтезаторов MilliGen/Biosearch 9500 и 9600

Основная идея модернизации заключалась в замене собственного реактора периодического действия синтезатора MilliGen/Biosearch на ПРПО (использование ПРПО в модели 9500 освободило реактор синтезатора для использования его в качестве преактиватора по образу модели 9600). На рис. 1 и 2 изображены модифицированные гидравлические схемы синтезаторов MilliGen/Biosearch 9500 и 9600. Для обеспечения

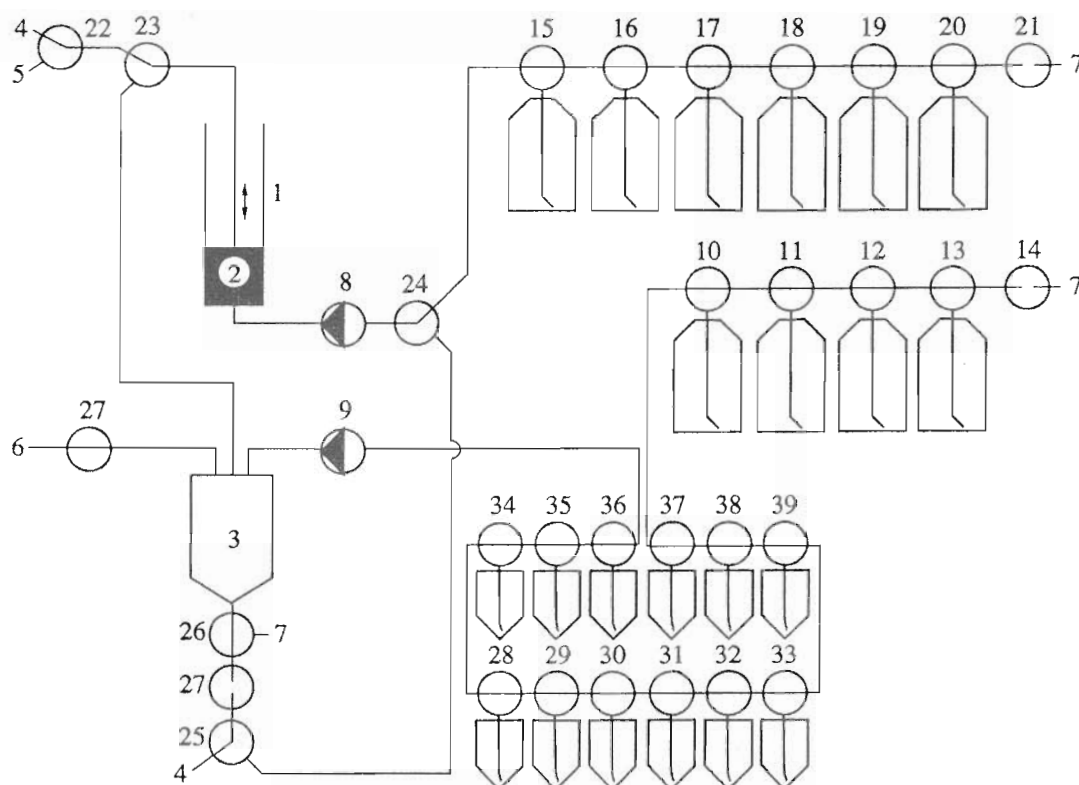


Рис. 1. Общая гидравлическая схема модернизированного синтезатора MilliGen/Biosearch 9500 со встроенным проточным реактором переменного объема. 1 – ПРПО; 2 – пептидил-полимер; 3 – преактивационный сосуд; 4, 5 – линии к сливным коллекторам; 6 – линия связи преактиватора с атмосферой; 7 – вход от источника газа; 8 – подающий мембранно-плунжерный насос; 9 – дозирующий насос; 10 – 12 – клапаны резервуаров активирующих реагентов; 13 – клапан резервуара с промывочным растворителем; 14, 21 – клапаны продувки газом жидкостных магистралей; 15 – 20 – клапаны резервуаров растворителей и реагентов; 22 – клапан выбора сливного коллектора; 23 – 25 – клапаны организации рециркуляции потока во время реакции конденсации; 26 – клапан организации перемешивания газом растворов реагентов в преактиваторе; 27 – клапан связи преактиватора с атмосферой; 28 – 39 – клапаны аминокислотных резервуаров. Стрелка указывает на возвратно-поступательное движение подвижного адаптера в реакторе.

проточного режима работы ПРПО (1), возможности параллельных процессов промывок пептидил-полимера (2) и активации аминокислотного производного в преактиваторе (3) гидравлическая схема содержит три основных контура:

- линию резервуаров растворителей и реагентов (15 – 20), подключенную через дополнительно установленный нами насос (8) с приводом серийного насоса ММС (Чехия) со смонтированной на нем специальной мембранно-плунжерной головкой, подсоединенную к ПРПО (1);

- линию активирующих реагентов (10 – 12) и растворителя (13) для промывки коммуникаций преактиватора через линию аминокислотных резервуаров (28 – 39 для модели 9500 и 28 – 47 для модели 9600), проходящую через ограничивающий дозирующий насос (9) и подсоединенную к преактиватору (3);

- систему клапанов (23 – 25) (для обеих моделей) и дополнительный клапан (26) для модели 9600, обеспечивающую режим рециркуляции раствора реагента из преактиватора (3) через ПРПО (1).

В ходе других операций синтетического цикла (не проходящих в режиме рециркуляции потока) прошедший через ПРПО растворитель/реагент через клапаны (22, 23) направляется в общий или дополнительный (для сильных кислот/оснований) коллектор слива – линии (4) и (5) соответственно.

Слив у клапана (25) сохранен для автономной промывки преактиватора (3) перед следующей конденсацией. В модели 9600, кроме того, были сохранены сливные клапаны (50, 51) (для возможности автономной промывки линий резервуаров) и направляющие клапаны (48, 49) (для выбора одной из линий аминокислотных резервуаров).

Газовые схемы претерпели незначительные изменения: все растворители/реагенты и аминокислотные производные хранятся под давлением инертного газа от источника (7), что обеспечивает защиту реактивов от атмосферных водяных паров и кислорода и подачу реагентов через ограничивающий насос (9). Для работы мембранно-плунжерного насоса (8) давление не обязательно: фактически подача растворителей/реагентов в ПРПО (1) производится не давлением газа, как

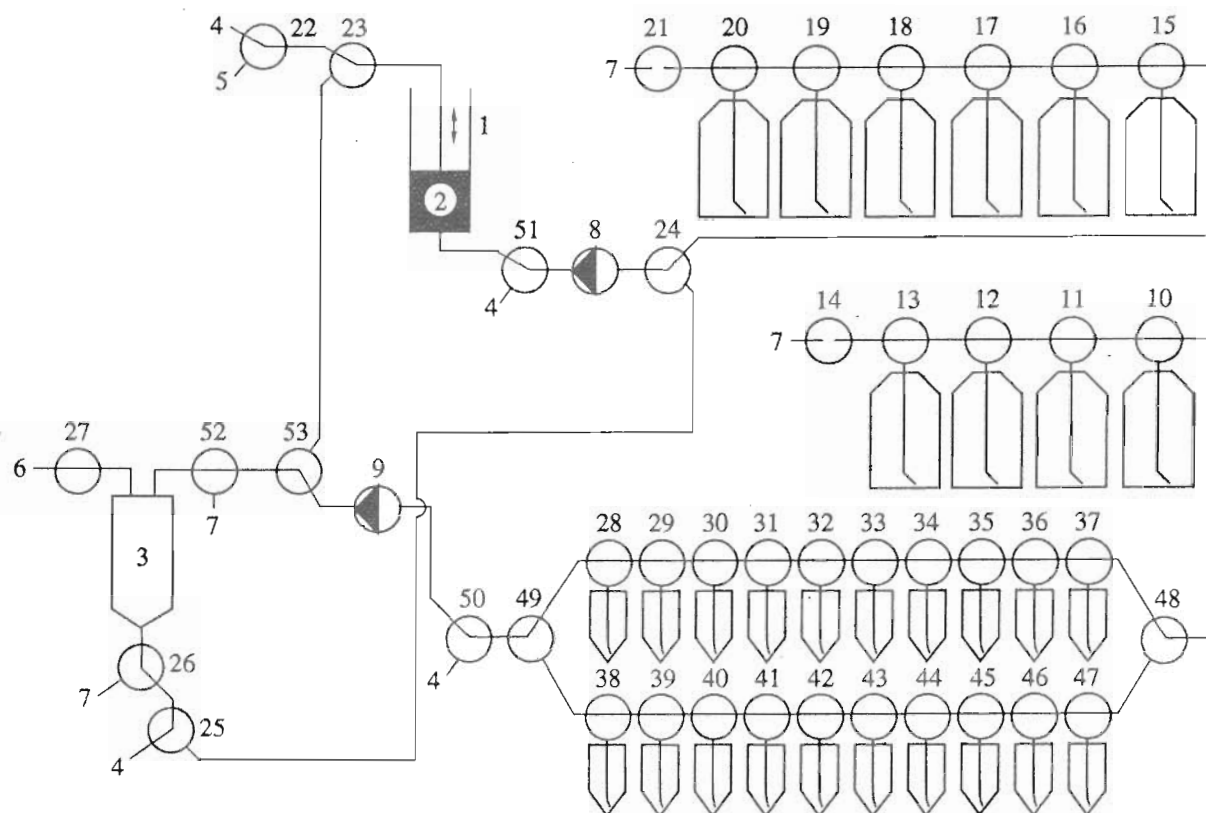


Рис. 2. Общая гидравлическая схема модернизированного синтезатора MilliGen/Biosearch 9600 со встроенным проточным реактором переменного объема. Позиции 1 - 27 и стрелка – см. подпись к рис. 1; 28 - 47 – клапаны аминокислотных резервуаров; 48, 49 – клапаны выбора линии аминокислотных резервуаров; 50 - 52 – сливные клапаны; 53 – клапан организации рециркуляции потока во время реакции конденсации.

в исходных конструкциях синтезаторов, а насосом (8). Кроме того, газ используется для перемешивания реагентов в ходе преактивации (через клапан 26) и продувки линий растворителей/реагентов (через клапаны (14) и (21)). В модели 9600 был сохранен газовый клапан (52) для обеспечения быстрого слива жидкости из преактиватора (3). Клапан (27), запирающий линию выхода в атмосферу (6), обеспечивает избыточное давление в преактиваторе (3) во время операций слива жидкости.

В модели 9500 в линию подачи газа в аминокислотные резервуары был встроен клапан сброса давления (аналогично модели 9600), что позволило сделать автоматическими операции растворения/активации аминокислотных производных непосредственно в резервуарах.

Сенсорные датчики переполнения и опорожнения реактора были использованы для контроля уровня жидкости в преактиваторе (3). Датчики давления газа были сохранены без изменений.

Разработка протокола синтеза

Использование в серийных синтезаторах ПРПО потребовало разработки нового протокола синтеза. За основу был взят ранее предложен-

ный контрастный протокол ТФСП [10]. Принципиальным отличием такого протокола является схема промежуточных отмывок пептидил-полимера в синтетическом цикле. В исходном неконтрастном протоколе используют многократные последовательные промывки набухшего полимерного носителя одним и тем же растворителем, причем даже смена растворителя (DMF на CH_2Cl_2 или наоборот) приводит к незначительному изменению объема. Использованный нами протокол включает в себя чередующиеся промывки пептидил-полимера растворителями, одни из которых его сжимают (например, смесь $t\text{BuOH/DMF}$), а другие переводят в набухшее состояние (DMF или CH_2Cl_2).

При этом мы исходили из предположения, что в процессе сжатия пептидил-полимера происходит вытеснение растворителя/реагента из гранул полимера. При следующей операции набухания происходит интенсивное поглощение пептидил-полимером чистого растворителя и, следовательно, разбавление оставшегося. Параллельно с этим процессом происходит постоянный диффузионный обмен между внутригранульной жидкой фазой и непрерывно поступающим извне растворителем. В совокупности оба процесса (разбавление

при сжатии/набухании и диффузионный обмен) приводят к более эффективному удалению остаточного реагента и, в конечном итоге, к сокращению количеств растворителей, необходимых для отмывки пептидил-полимера.

Кроме того, использование при контрастном протоколе светллографического мониторинга позволяет точно определять моменты завершения операций набухания/сжатия. И при наличии обратной связи система управления синтезом может использовать их для подачи команд на переход к следующей операции.

К сожалению, в управляющих схемах синтезаторов MilliGen/Biosearch 9500 и 9600 подобная обратная связь не предусмотрена, а ее создание потребовало бы коренной переработки всей электронной схемы приборов.

Поэтому система светллографического мониторинга ПРПО использовалась нами лишь на предварительных стадиях разработки протокола. В дальнейшей работе в автоматическом режиме светллографический мониторинг служил только для протоколирования изменений объема полимерного носителя в ходе синтеза.

Предварительно проведенные эксперименты с сополимером 1% дивинилбензола со стиролом, который являлся основой для всех использованных нами в работе полимерных носителей, показали, что для полного уравнивания 1 г полимера (при скорости потока 5 мл/мин) как при набухании, так и при сжатии необходимо 8 - 9 мл растворителя. На основании этих данных были взяты следующие усредненные исходные объемы: 8.5 мл/г для полимерсжимающих реагентов и 8.7 мл/г для остальных.

В большинстве случаев с ростом пептидной цепи происходит увеличение объема пептидил-полимера, причем наиболее значительное при присоединении первых аминокислотных остатков. Полагая, что увеличение объема пептидил-полимера в результате присоединения очередного аминокислотного остатка пропорционально приросту массы, а следовательно, концентрации свободных аминогрупп на полимере, мы ввели масштабирование объемов растворителей, используемых в операциях синтетического цикла. Для каждого цикла присоединения аминокислотного остатка производится увеличение объемов на величину, прямо пропорциональную исходной концентрации свободных аминогрупп и обратно пропорциональную позиции остатка с С-конца последовательности пептида. Последнее, как уже отмечалось выше, связано с отставанием роста объема пептидил-полимера от прироста массы по мере удлинения пептидной цепи, наблюдавшимся нами экспериментально. Таким образом, мы стремились избежать неоправданно больших расходов растворителей на поздних стадиях синтеза.

На практике данное приращение объемов составляло 5 - 20% от исходного объема растворителей для первого аминокислотного остатка и 7 - 35% - для последующих.

Основной операцией синтетического цикла является реакция конденсации, скорость протекания которой прямо пропорциональна концентрации активированного аминокислотного производного. Для сокращения расходов дорогостоящих производных аминокислот и повышения концентрации промежуточного активного соединения необходимо минимизировать реакционный объем. С этой целью предварительно набухший (например, в легклетучем CH_2Cl_2) пептидил-полимер продували током инертного газа для удаления балластного межгранульного растворителя, что существенно уменьшало разбавление реакционной смеси.

Поскольку реакция конденсации при использовании ПРПО протекает в режиме рециркуляции потока, для расчета реакционных объемов необходимо учитывать "мертвый" объем коммуникаций, а также и наблюдаемое в большинстве случаев дополнительное набухание пептидил-полимера в ходе реакции. На основе этих экспериментально определенных параметров была создана программа, которая рассчитывает максимально возможную для данного синтеза концентрацию аминокислотных производных с учетом заданных массы и степени загрузки полимера, избытка и методов активации аминокислотных производных при минимально допустимом объеме конденсирующей смеси.

Разработанные для Fmoc- и Boc-стратегии синтеза протоколы позволяют использовать различные методы активации как растворенных, так и твердых аминокислотных производных: прямой карбодимидный метод, получение активированных эфиров *in situ*, использование готовых активированных эфиров с катализом или без.

В табл. 1 и 2 приведены примеры синтетических циклов конденсации аминокислотного остатка для Fmoc- и Boc-стратегии синтеза.

С использованием разработанных протоколов на модифицированных синтезаторах MilliGen/Biosearch 9500 и 9600 нами был осуществлен синтез ряда пептидов, последовательности которых приведены в табл. 3.

Полученные результаты показали эффективность и экономичность использования ПРПО и разработанного протокола синтеза по сравнению с исходными. В табл. 4 и 5 приведены сравнительные данные по материальным затратам на синтез вышеуказанных пептидов. Сопоставляя материальные балансы синтезов по протоколам, предложенным экспертной системой фирмы MilliGen/Biosearch и нами, можно отметить следующее.

Общая относительная экономия растворителей, затраченных на синтез одного пептида, колеблется от 2.3 (Woc-стратегия синтеза) до 4.6 раза (Fmoc-стратегия синтеза). Основная экономия приходится на два базовых растворителя – DMF и CH_2Cl_2 (см. табл. 4). Аналогичная тенденция наблюдалась и для аминокислотных производных, где сокращение их затрат составило от 1.8 до 3 раз на синтез одного пептида при среднем значении 2.4 (табл. 5а и 5б).

Кроме того, как это видно из табл. 6, сократилось общее время синтеза пептидов при использовании разработанных протоколов.

Таким образом, использование ПРПО (имеющего нулевой “свободный” объем) для модификации серийных синтезаторов MilliGen/Biosearch 9500, 9600 в сочетании с разработанным нами протоколом синтеза приводит к существенной экономии как растворителей, так и аминокислотных производных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов

В работе использовали аминокислотные производные и реактивы фирм Novabiochem (Швейцария), Fluka (Швейцария), LKB Biochrom (Великобритания), Sigma (США), Merck (Германия). Пептиды были синтезированы твердофазным методом на модернизированных автоматических синтезаторах MilliGen/Biosearch 9500 и 9600 (США) с использованием разработанных нами протоколов. В качестве исходных носителей применялись *n*-(гидроксиметил)фенилоксиметил- и *n*-(гидроксиметил)фенилацетамидометил-полимеры (Novabiochem). Конденсация Woc-His(Tos) производилась карбодиимидным методом, Fmoc-Asp и Fmoc-Gln – в виде пентафторфениловых эфиров с 1-гидроксибензотриазолом в качестве катализатора (1.1 эквивалента; растворение аминокислотных производных производилось в аминокислотных

Таблица 1. Протокол синтетического цикла присоединения Fmoc-Leu-OH в виде 1-гидроксибензотриазолового эфира, полученного *in situ*, в синтезе пептида F4 (0.5 г *n*-(гидроксиметил)-фенилоксиметилполимера с начальной загрузкой 0.45 ммоль/г; концентрация аминокислоты 1 М, конденсирующих реагентов 0.5 М; скорость потока через ПРПО 5 мл/мин)

Номер операции	Реактор			Преактиватор		
	операция	объем, мл	время, мин:с	операция	объем, мл	время, мин:с
1	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF (2 : 1)	1.08	00:13	Подача HOBt/DMF (0.54 ммоль)	1.08	00:13
2*	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF (2 : 1)	1.08	00:13	Подача DIC/DMF (0.54 ммоль)	1.08	00:13
3	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF (2 : 1)	3.99	00:48	Подача Fmoc-Leu-OH/DMF (0.5 ммоль), начало активации	0.50	00:16
4	Промывка DMF	6.23	01:15			
5	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF (2 : 1)	6.14	01:14			
6	Промывка DMF	6.23	01:15			
7	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF (2 : 1)	6.14	01:14			
8	Промывка CH_2Cl_2	6.23	01:15			
9	Продувка газом		01:13	Подача DMF	1.08	00:13
10	Рециркуляция раствора активированной аминокислоты		120:00			
11	Промывка DMF	6.23	01:15	Промывка DMF	6.23	01:15
12**	Определение остаточных аминогрупп на полимере, при необходимости возврат к № 1					
13	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF	6.14	01:14			
14	Промывка DMF	6.23	01:15	Промывка DMF	6.23	01:15
15	Деблокирование 20% пиперидином в DMF/толуол (1 : 1)	34.86	07:00			
16	Промывка DMF	6.23	01:15			

* Только при получении активированных эфиров *in situ*.

** Определение остаточных аминогрупп производится выборочно. При заранее заданной двойной конденсации возврат к операции № 1 производится автоматически.

Таблица 2. Протокол синтетического цикла присоединения Вос-Pro-OH в виде 1-гидроксибензотриазолового эфира, полученного *in situ*, в синтезе пептида В1 (0.5 г *l*-(гидроксиметил)-фенилацетамидометилполимера с начальной загрузкой 0.35 ммоль/г; концентрация аминокислоты 0.89 М, конденсирующих реагентов 0.5 М; скорость потока через ПРПО 5 мл/мин)

Номер операции	Реактор			Преактиватор		
	операция	объем, мл	время, мин:с	операция	объем, мл	время, мин:с
1	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF (2 : 1)	1.00	00:12	Подача НОВt/DMF (0.50 ммоль)	1.00	00:12
2*	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF (2 : 1)	1.00	00:12	Подача DIC/DMF (0.50 ммоль)	1.00	00:12
3	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF (2 : 1)	3.58	00:43	Подача Вос-Pro-OH/DMF (0.52 ммоль), начало активации	0.58	00:07
4	Промывка 5% Et ₃ N/CH ₂ Cl ₂	6.23	01:15			
5	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF (2 : 1)	6.14	01:14			
6	Промывка CH ₂ Cl ₂	6.23	01:15			
7	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF (2 : 1)	6.14	01:14			
8	Промывка CH ₂ Cl ₂	6.23	01:15			
9	Продувка газом		01:13	Подача DMF	1.00	00:12
10	Рециркуляция раствора активированной аминокислоты		60:00			
11	Промывка DMF	6.23	01:15	Промывка DMF	6.23	01:15
12**	Определение остаточных аминогрупп на полимере, при необходимости возврат к № 1					
13	Промывка CH ₂ Cl ₂	6.23	01:15			
14	Промывка 50% TFA/CH ₂ Cl ₂	6.23	01:15			
15	Деблокирование 50% TFA/CH ₂ Cl ₂ в режиме рециркуляции	06.23	18:45			
16	Промывка CH ₂ Cl ₂	6.23	01:15			
17	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF	6.14	01:14			
18	Промывка 5% Et ₃ N/CH ₂ Cl ₂	6.23	01:15	Промывка 5% Et ₃ N/CH ₂ Cl ₂	6.23	01:15
19	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF	6.14	01:14			
20	Промывка 5% Et ₃ N/CH ₂ Cl ₂	6.23	01:15	Промывка 5% Et ₃ N/CH ₂ Cl ₂	6.23	01:15
21	Промывка <i>t</i> BuOH/DMF	6.14	01:14			
22	Промывка DMF	6.23	01:15	Промывка DMF	6.23	01:15

*, ** См. примечания к табл. 1.

Таблица 3. Синтезированные пептиды

Шифр пептида	Аминокислотная последовательность	Стратегия синтеза	Модель синтезатора
B1	KGFVLFHKIPLDG	Вос	9600
F1	KGKQKCA YFAS	Fmoc	9600
F2	EEPEVQSGDVS YPRSHGFRE	Fmoc	9600
F3	AGDDDLQGD L NGDDRRAGFGS	Fmoc	9600
F4	CYIQNCPLGK	Fmoc	9500

резервуарах), остальных аминокислотных остатков – в виде 1-гидроксibenзотриазоловых эфиров, полученных *in situ*.

Окисление H-Cys(Acm)-Tyr(*t*Bu)-Ile-Gln-Asn-Cys(Acm)-Pro-Leu-Gly-Lys(Вос)-полимера трифторацетатом таллия (III). Дисульфидный мостик пептида F-4 замыкали параллельно с окислительным деблокированием боковых сульфгидрильных групп остатков цистеина [13]: к охлажденной до 0°C суспензии 930 мг пептидил-полимера в 8 мл DMF добавили раствор 55 мг (0.1 ммоль) трифторацетата таллия (III) в 3 мл DMF и перемешивали 1 ч при 0°C, после чего отфильтровали полимер, промыли DMF (3 × 15 мл) и MeOH (2 × 15 мл) и высушили.

Конечное деблокирование пептидов. Деблокирование и отщепление от полимерного носителя пептида В-1 проводили фтористым водородом в присутствии *l*-крезола (9 : 1) в течение 1 ч при 0°C: после упаривания фтористого водорода реакционную смесь промывали эфиром (3 × 20 мл) на стеклянном фильтре, пептид экстрагировали последовательно 10, 20 и 50% уксусной кислотой (по 20 мл) и лиофилизировали.

Деблокирование и отщепление от полимерного носителя пептидов F1 - F4 проводили трифторуксусной кислотой в присутствии скавенджеров: для пептида F1 – 5% этандитиола, F2 и F3 – 5% анизола и 1% этандитиола, F4 – 5% тиоанизола. Обработка пептидил-полимеров деблокирующим агентом проводилась при комнатной температуре в течение 1.5 - 2 ч в случае пептидов F1 и F4 и 8 ч для пептидов F2 и F3. Полимерный носитель отфильтровывали, раствор упаривали на роторном испарителе, остаток растирали в 300 мл эфира и оставляли на ночь при -10°C. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром (5 × 10 мл) и сушили в вакууме.

Очистка и идентификация синтезированных пептидов

Полученные после деблокирования сырые продукты растворяли в 2 - 4 мл 5 - 10% уксусной кислоты и центрифугировали 5 мин (15 тыс. об/мин). Супернатант подвергали гель-фильтрации на колонке (2.5 × 75 см) с носителем Toyopearl HW-40SF в 0.1 М уксусной кислоте при скорости элюции 90 мл/ч. Детекцию по поглощению осуществляли на длинах волн 226 и 280 нм, элюат фракционировали по времени. Фракции, содержащие преимущественно целевой продукт (по данным ВЭЖХ), объединяли и лиофилизировали. Качественная характеристика полученных продуктов приведена в табл. 7.

При необходимости проводили дополнительную очистку препаратов ионообменной FPLC (В1, F1 и 2 – на колонке Mono-S HR 16/10, F3 – на колонке Mono-Q HR 16/10 (Pharmacia/LKB, Швеция)) в фосфатно-солевых буферных системах с последующим обессоливанием.

Полученные продукты с чистотой 97 - 99% (по данным аналитической ВЭЖХ) подвергали кислотному гидролизу (6 н. HCl, 110°C, 24 ч) и анализировали на автоматическом аминокислотном анализаторе (Biotronic LC5000, ФРГ). Данные аминокислотных анализов подтвердили состав синтезированных пептидов.

Аналитическую ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа System Gold (Beckman, США) на колонках Synchropak C4, 4.1 × 250 (Alltech Ass., США) и Nucleosil 300-7 C4, 4.1 × 250 (Macherey Nagel, ФРГ). Элюцию осуществляли линейным градиентом ацетонитрила (2%/мин) в 0.1% TFA (система I) либо ацетонитрила (2.33%/мин) в 50 mM NaH₂PO₄, pH 4.5 (система II). Детекцию по поглощению проводили на длине волны 220 нм с количественным обсчетом по площадям пиков

Таблица 4. Расход растворителей (мл) на синтез пептидов по стандартному (С) и модифицированному (М) протоколам

Растворитель	Шифр пептида														
	В1			F1			F2			F3			F4		
	С	М	С/М	С	М	С/М	С	М	С/М	С	М	С/М	С	М	С/М
DMF	1402	440	3.2	1945	593	3.3	3688	1171	3.1	4410	1596	2.8	3920	985	4.0
CH ₂ Cl ₂	3711	940	3.9	1887	186	10.1	3486	525	6.6	4164	535	7.8	3270	120	26.8
Толуол	0	0		86	121	0.7	154	220	0.7	164	144	1.2	167	177	1.0
MeOH	84	0		54	8	6.8	54	7	7.7	54	7	7.7	64	4	
<i>t</i> BuOH	0	850		0	187		0	433			529		0	331	
Суммарно	5197	2230	2.3	3972	1095	3.6	7382	2356	3.1	879	2811	3.1	7421	1614	4.6

Таблица 5. Расход аминокислотных производных (ммоль) на синтез пептидов F1 - F4 (Fmoc-стратегия) (а) и пептида B1 (Woc-стратегия) (б) по стандартному (С) и модифицированному (М) протоколам

Аминокислотное производное	а												б		
	F1			F2			F3			F4			B1		
	С	М	С/М	С	М	С/М	С	М	С/М	С	М	С/М	С	М	С/М
Fmoc-Ala-OH	4.31	1.74	2.5				4.31	1.76	2.4				2.67	1.33	2.0
Fmoc-Arg(Mtr)-OH				4.31	1.25	3.4	5.74	2.35	2.4				1.33	0.67	2.0
Fmoc-Asp-OPfp							1.00	0.60	1.7	3.00	0.50	6.0	1.33	0.67	2.0
Fmoc-Asp(tBu)-OH				2.94	1.25	2.4	12.7	4.70	2.7				2.67	1.33	2.0
Fmoc-Cys(Trt)-OH	1.47	0.50	2.9							3.00	1.50	2.0	2.67	2.67	1.0
Fmoc-Gln-OPfp	1.00	0.50	2.0	1.00	0.50	2.0	2.00	0.60	3.3	3.00	1.00	3.0	4.00	2.00	2.0
Fmoc-Glu(tBu)-OH				5.69	3.00	1.9							4.00	2.67	1.5
Fmoc-Gly-OH	1.47	0.65	2.3	2.87	1.83	1.6	7.78	4.11	1.9	1.50	0.50	3.0	1.33	1.33	1.0
Fmoc-His(Trt)-OH				1.47	1.00	1.5							2.67	1.33	2.0
Fmoc-Ile-OH										3.00	0.50	6.0			
Fmoc-Leu-OH							5.74	2.35	2.4	1.50	1.00	1.5			
Fmoc-Lys(Woc)-OH	5.69	1.83	3.1							3.00	1.00	3.0	4.00	2.67	1.5
Fmoc-Phe-OH	1.47	0.50	2.9	1.47	1.00	1.5	1.47	1.18	1.2				1.33	1.33	1.0
Fmoc-Pro-OH				2.87	2.42	1.2				1.50	0.50	3.0			
Fmoc-Ser(tBu)-OH				4.27	3.00	1.4	2.94	1.18	2.5						
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	1.47	1.24	1.2	1.47	1.25	1.2				3.00	1.00	3.0	2.67	1.33	2.0
Fmoc-Val-OH				5.74	2.42	2.4									

Таблица 6. Полные времена синтеза пептидил-полимеров

Шифр пептида	Полное время синтеза, ч:мин	
	стандартный протокол	модифицированный протокол
B1	48:47	36:51
F1	31:12	15:44
F2	60:41	46:10
F3	78:11	53:32
F4	40:36	37:17

Таблица 7. Выход и чистота продуктов после первой стадии очистки (гель-фильтрации)

Шифр пептида	Выход*, %	Чистота ^{2*} , %	R _t , мин
B1	72	80	24.3 ^{3*}
F1	68	85	22.9 ^{3*}
F2	83	65	21.8 ^{3*}
F3	82	70	13.2 ^{4*}
F4	66	90	11.8 ^{3*}

* По основной фракции, содержащей целевой продукт.

^{2*} По данным ВЭЖХ.

^{3*} Аналитическая ВЭЖХ в системе I (см. "Эксп. часть").

^{4*} Аналитическая ВЭЖХ в системе II (см. "Эксп. часть").

на интеграторе Chromatorac C-R6A (Shimadzu, Япония).

Авторы выражают благодарность акад. В.Т. Иванову (ИБХ РАН) за ценные замечания, а также Л.Ф. Марковой и Т.А. Мурановой (Филиал ИБХ РАН) за проведение аминокислотных анализов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Проспект фирмы Labortec AG (Швейцария). The Labortec Peptide Synthesizer SP 650. 1990. С. 6.
2. Bridgham J., Geiser T.G., Hunkapiller M.W., Kent S.B.H., Mariott M.P., Ramstad P.O., Nordman E.S. Automated Polypeptide Synthesis Apparatus: Пат. 4668476 (США). 1987. С. 31.
3. Проспект фирмы Applied Biosystems (США). Peptide Synthesis System 431A/151A. 1987. С. 6.
4. Проспект фирмы Beckman (США). The Model 990 Protein Peptide Synthesizer. 1972. С. 54.
5. Проспект фирмы Biotronic (ФРГ). Synostat P. Peptide Synthesizer. 1988. С. 20.
6. Проспект фирмы Advanced ChemTech, Inc. (США). Automated Peptide Synthesizer Model 200 & 100. 1989. С. 4.
7. Проспект фирмы Biosearch (США). Biosearch Model 9500 Peptide Synthesizer. Bulletin № 9500-1 1085. 1985. С. 5.
8. Бару М.Б., Родионов И.Л., Шестаковский Л.Я., Ларин В.Т. Проточный реактор для твердофазного синтеза биополимеров: А. с. 1650240 СССР // Б. И. 1991. № 19. С. 3.
9. Бару М.Б., Родионов И.Л., Шестаковский Л.Я., Ларин В.Т. Способ управления процессом твердофазного синтеза биополимеров: А. с. 1744087 СССР // Б. И. 1992. № 24. С. 5.
10. Rodionov I.L., Baru M.B., Ivanov V.T. // Peptide Res. 1992. V. 5. № 2. P. 119 - 125.
11. Baru M.B., Rodionov I.L. // Peptide Chemistry 1992. Proc. 2nd Japan Symp. on Peptide Chemistry / Ed. Yanaihara N. Leiden: ESCOM Science Publishers B.V., 1993. P. 119 - 121.
12. Baru M.B., Peschenko I.A., Rodionova L.N., Rodionov I.L. // Peptide Chemistry 1992. Proc. 2nd Japan Symp. on Peptide Chemistry / Ed. Yanaihara N. Leiden: ESCOM Science Publishers B.V., 1993. P. 116 - 118.
13. Fujii N., Otaka A., Funakoshi S., Bessho K., Yajima H. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1987. P. 163 - 164.

Optimization of Protocol for Automatic Solid Phase Peptide Synthesis Using Variable Volume Flow-Reactor

S. A. Moshnikov, L. G. Mustaeva, A. V. Danilov, I. E. Suhov*, and M. B. Baru[#]

The Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast', 142292 Russia

* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117871, Moscow, GSP-7, Russia

Abstract – The protocol for solid phase peptide synthesis using automatic synthesizers MilliGen/Biosearch 9500 and 9600 with built-in variable volume flow-reactors has been elaborated. The data of swellographic monitoring were used for optimization of process parameters. The peptides involving from 10 to 21 amino acid residues were synthesized using developed protocol. Significant economy of reagents and solvents has been demonstrated for synthesis of good quality peptides.

Key words: solid phase peptide synthesis; variable volume flow-reactor; swellographic monitoring.

[#] To whom correspondence should be addressed.