



УДК 577.112.6:542.953

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ И ЖИДКОСТНОЙ КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ "СинХром"

II.* ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ТВЕРДОФАЗНОМ СИНТЕЗЕ ПЕПТИДОВ И ЖИДКОСТНОЙ КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 1995 г. М. Б. Бару[#], В. В. Черский¹, А. В. Данилов, С. А. Мошников, Л. Г. МустаеваФилиал Института биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142292, Пушино¹ НПО "СинХро", Пушино

Поступила в печать 12.07.94 г.

Описан автоматический твердофазный синтез пептидов с использованием комплекса "СинХром". Рассмотрены и обсуждены проблемы применения свеллографического мониторинга. Использован комплексный (свеллографический, спектрофотометрический и манометрический) мониторинг за ходом всех операций синтетического цикла. Продемонстрированы возможности использования комплекса в жидкостной колоночной хроматографии.

Ключевые слова: твердофазный синтез пептидов; жидкостная колоночная хроматография; автоматический синтезатор; мониторинг свеллографический, спектрофотометрический, манометрический; проточный реактор переменного объема.

Комплекс "СинХром" представляет собой набор универсальных исполнительных устройств, управляемых как жестко, по времени, так и с коррекцией в реальном времени по сигналу от какого-либо внешнего датчика – по обратной связи. Наличие такой обратной связи и обуславливает особенности алгоритмов его работы в ТФСЦ и ЖКХ. В настоящей работе рассматривается практическое использование автоматизированного комплекса "СинХром" в ТФСЦ и ЖКХ.

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ

Для наблюдения за прохождением операций синтетического цикла в ТФСЦ нами был использован оригинальный датчик определения высоты слоя полимерного носителя в ПРПО, с помощью которого осуществлялся непрерывный контроль за состоянием системы по одному из ее макропа-

раметров – объему пептидилполимера (свеллографический мониторинг). Использование такого мониторинга обусловило особенности синтетического протокола автоматического ТФСЦ для разработанного прибора.

Объекты для твердофазного синтеза пептидов

В качестве конкретных примеров для демонстрации особенностей автоматического синтеза пептидов с использованием автоматизированного комплекса "СинХром" были взяты пептиды различной длины (табл. 1). Пептид (I) – N-концевой фрагмент саркотоксина (синтезирован для изучения механизма его антимикробного действия); пептид (II) – модельная "трудная" для синтеза последовательность; пептид (III) – фрагмент фактора дифференцировки человеческой промиелоцитарной линии HL-60 (для структурно-функциональных исследований фактора); пептид (IV) – аналог окситоцина (репер для обработки методики получения окситоцина геино-инженерным путем).

Протокол автоматического ТФСЦ

Общеизвестно, что гранулы пептидилполимера изменяют свой объем в зависимости от состава и природы сольватирующей его (взаимодействующей с ним) жидкой фазы. Для того чтобы на основании таких изменений объема построить

* Сообщение I см. [1].

Принятые сокращения: ТФСЦ – твердофазный синтез пептидов, ЖКХ – жидкостная колоночная хроматография, ПРПО – проточный реактор переменного объема, ПА – подвижный адаптер, Вос – трет-бутилоксикарбонил, Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил, DMF – диметилформамид, НОВт – 1-гидроксибензотриазол, Mtr – 4-метокси-2,3,6-триметилбензилсульфонил, Pfp – пентафторфенил, TFA – трифтороуксусная кислота, Trt – трифенилметил, tBu – трет-бутил, Fmoc-ТФСЦ – ТФСЦ с использованием Fmoc-стратегии.

[#] Автор для переписки.

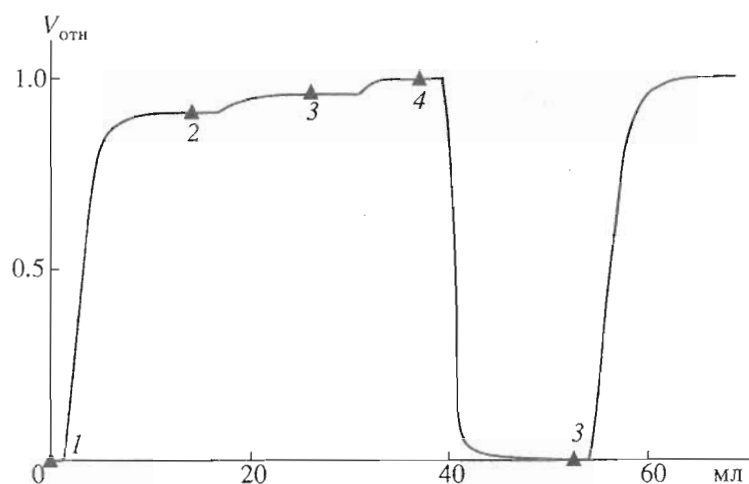


Рис. 1. Зависимость объема 1 г Bio-Beads S-X1 от состава сольватирующей его жидкой фазы. Скорость потока через ПРПО 0.25 мл/мин. Моменты начала подачи соответствующих реагентов через ПРПО: 1 – 2%, 2 – 1%, 3 – 0%, 4 – 75% (об./об.) *t*BuOH в DMF соответственно. Ось абсцисс – объем жидкости, прокачанной через ПРПО; ось ординат – относительный объем полимерной подложки: “0” – в 75% *t*BuOH в DMF, “1” – в DMF.

систему мониторинга, эти изменения должны быть значительными по величине и гарантированно фиксируемыми. Для практической оценки чувствительности метода была исследована зависимость объема полимерной подложки (Bio-Beads S-X1) от состава сольватирующей его жидкой фазы. Результаты модельного эксперимента (см. рис. 1) показали, что светлографический мониторинг позволяет зафиксировать разницу в соотношении растворителей (например, *t*BuOH в смеси с DMF), составляющих жидкую фазу, порядка 1%.

В подавляющем большинстве применяемых в настоящее время протоколов автоматического синтеза пептидов [2 – 8] в ходе отдельных операций синтетического цикла (например, при промывках после реакций деблокирования и конденсации) используются растворители или их смеси, при смене которых объем пептидполимера изменяется незначительно. Поэтому для повышения чувствительности метода с светлографическим мониторингом нами был применен предложенный ранее контрастный протокол [9, 10].

В качестве реагента, “контрастирующего” объем пептидполимера, нами были использованы смеси растворителей различного состава. Растворители, сильно сжимающие гранулы носителя (*t*PrOH, *t*BuOH, гексан) нежелательны вследствие низкой растворимости в них отмываемых продуктов реакций, а также из-за резкого уменьшения скорости диффузии. По нашему опыту оптимальны “мягкие” сжимающие смеси следующего состава: *t*BuOH–DMF (3 : 1), *t*BuOH–MeCN (1 : 1), DMF–MeCN (1 : 1). С этой же целью увеличения контрастности протокола при деблокировании использовался пиперидин в смеси DMF–толуол (6 : 7 : 7).

Соответствующая такому протоколу “идеальная” светлoграмма (развертка по времени сигнала потенциометрического датчика ПРПО) для Fmoc-ТФСП приведена на рис. 2. Протокол для

Таблица 1. Последовательности синтезированных пептидов

Шифр пептида	Аминокислотная последовательность
(I)	GWLKKIGKKIERVGNHTR–NH ₂
(II)	AATAATAATG
(III)	TGENHR
(IV)	CYIQNCPLGK

Таблица 2. Типовой контрастный протокол синтетического цикла Fmoc-ТФСП*

Номер операции	Операция	T_3^1 T_3^2	
		мин	
1	DMF	1	1
2	Пиперидин/DMF/толуол (6 : 7 : 7)	1	3
3	DMF	1	1
4	<i>t</i> BuOH/DMF (3 : 1)	1	1
5	DMF	1	1
6	Активированное производное Fmoc-аминокислоты	1	90
7	DMF	1	1
8	<i>t</i> BuOH/DMF (3 : 1)	1	1

* Адаптирован для автоматизированного комплекса “Син-Хром” с использованием светлографического мониторинга, ориентированного на момент стабилизации сигнала потенциометрического датчика (исходная масса полимера 0.5 г; скорость потока 2 мл/мин. Параметры платоопределителя: число проверяемых точек 7, интервал между точками 0.2 мин, допустимая разница между двумя соседними величинами сигнала потенциометрического датчика – 4 условные единицы).

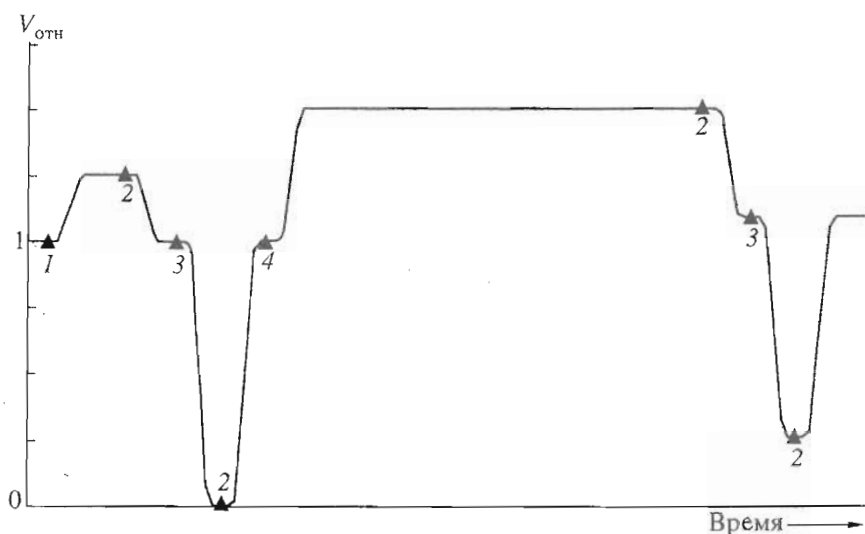


Рис. 2. "Идеальная" светлогрaмма синтетического цикла Fmoc-ТФСП. Моменты начала подачи соответствующих реагентов через ПРПО: 1 – пиперидин/DMF/толуол (6 : 7 : 7); 2 – DMF; 3 – *t*BuOH/DMF (3 : 1); 4 – активированное производное Fmoc-аминокислоты (операция проходит в режиме рециркуляции потока). За единицу принят объем пептидильного полимера в DMF перед началом цикла, за ноль – в *t*BuOH/DMF (3 : 1) до прохождения реакции конденсации.

Вос-стратегии ТФСП строятся по аналогичному принципу [11].

Как видно из табл. 2, каждой операции синтетического цикла типового контрастного протокола Fmoc-ТФСП соответствуют определенные времена задержек T_3^1 и T_3^2 , а всему циклу – параметры платоопределителя. Длительность отдельной операции цикла – это сумма времен задержек ($T_3^1 + T_3^2$) и времени, необходимого для достижения и определения "плато". Для объяснения принципов расчета данных параметров рассмотрим более подробно элементарную операцию синтетического цикла (рис. 3).

В точке 1 по команде управляющего модуля происходит переключение распределительного

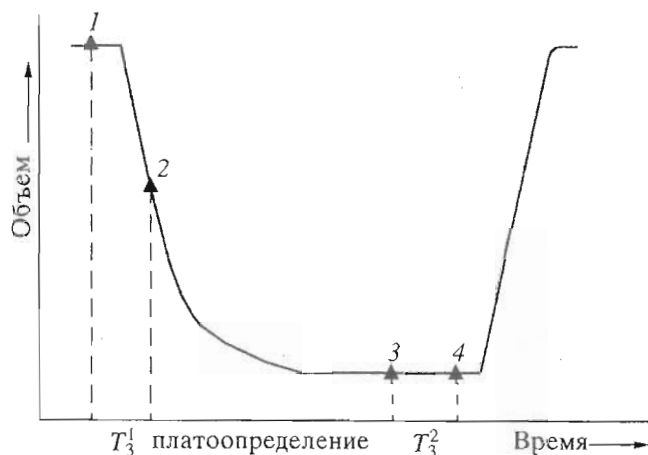


Рис. 3. Светлогрaмма, иллюстрирующая изменения объема слоя полимерного носителя при однократном акте сжатия/набухания (пояснения см. в тексте).

устройства на подачу сжимающего реагента. Очевидно, что требуется определенное время, зависящее от мертвого объема коммуникаций и скорости подачи, для того чтобы реагент достиг входа в реактор. Кроме того, требуется время на отклик полимерного носителя на изменение условий, зависящее от его количества и физико-химической природы. Совокупность этих времен и составляет T_3^1 , определяемое полуэмпирически.

После отработки программой T_3^1 (точка 2) начинается обработка сигнала потенциометрического датчика реактора. Решение о достижении момента стабилизации сигнала (которое принимает управляющий модуль) определяется тремя параметрами: числом проверяемых точек, интервалом времени и разницей показаний между двумя соседними отсчетами. Практически эти параметры описывают предел производной сигнала по времени и выбираются в зависимости от скорости его изменения в реальном процессе сжатия/набухания. Когда определитель плато регистрирует заданное число точек, не выходящих из допуска, считается, что произошла стабилизация сигнала (точка 3). Этому моменту соответствует близкое к равновесному состояние полимерного носителя, степень реального приближения к которому будет рассмотрена ниже.

При корректном определении момента стабилизации объема параметр T_3^2 может быть задан близким к нулю. Однако это не распространяется на случаи процессов, неоднозначно связанных с изменением объема пептидильного полимера (например, в реакции конденсации или в случае отсутствия изменения объема при смене растворителей/реагентов),

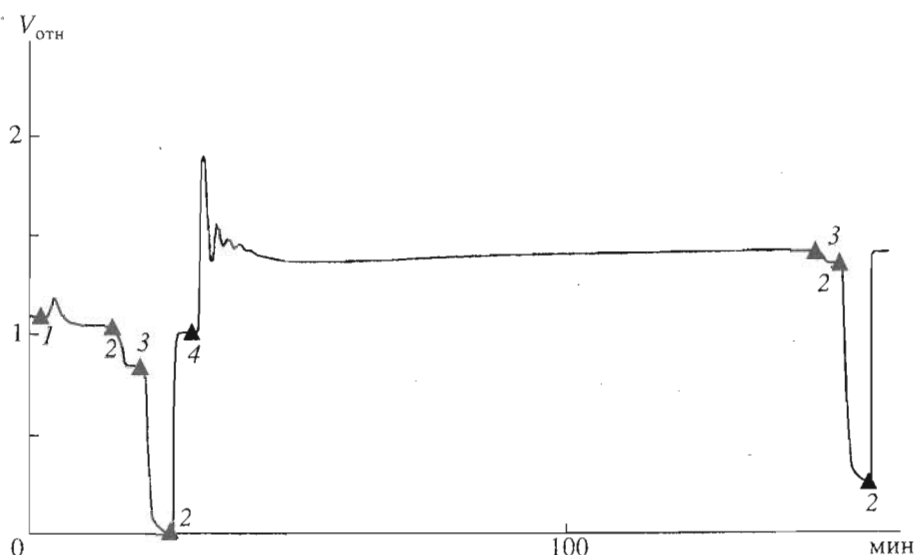


Рис. 4. "Реальная" (типичая) светлограмма синтетического цикла на примере присоединения Fmoc-Lys(Boc) в виде 1-гидроксибензотриазолового эфира к IleGlu(tBu)Arg(Mtr)ValGlyAsnHis(Trt)Thr(tBu)Arg(Mtr)-полимеру в синтезе пептида (I) (см. табл. 2). Обозначения и масштаб $V_{отн}$ — см. подпись к рис. 2.

когда T_3^2 (интервал между точками 3 и 4) должно отличаться от нуля. После определения "плато" и отработки T_3^2 управляющий модуль переходит к выполнению следующей операции синтетического цикла.

Таким образом, при использовании обратной связи длительность отдельных операций синтетического цикла (и, следовательно, всего синтеза как их суммы) определяется скоростью достижения системой того или иного состояния равновесия.

*Физико-химические основы
светлографического мониторинга*

Теоретически при прохождении практически любой операции в ТФСП происходит изменение либо самого пептидилполимера, либо его окружения и, как следствие, меняется степень его набухания*. И для контроля за этими изменениями можно использовать светлографический мониторинг. Однако реальное изменение сигнала потенциометрического датчика в ходе синтеза может значительно отличаться от идеального случая (рис. 2), что усложняет и ограничивает его использование. Для иллюстрации возможных отличий на рис. 4 представлена "реальная" светлограмма синтетического цикла, полученная в ходе синтеза пептида (I).

"Неидеальное" поведение системы, являющейся открытой и динамической, вызвано тем, что сигнал потенциометрического датчика, стро-

го говоря, соответствует не объему, занимаемому гранулами свободно набухшего пептидилполимера, а положению подвижного адаптера. Для объяснения реальной связи между ними необходимо рассмотреть факторы, определяющие положение подвижного адаптера. На рис. 5 изображены основные силы, действующие на ПА в процессе работы ПРПО:

- внешняя сила сжатия mg , равная весу груза и адаптера;
- гидродинамическое давление на адаптер

$$F_r = S\Delta P, \tag{1}$$

где ΔP – падение давления жидкости на ПА, S – нормальная составляющая площади адаптера, равная площади поперечного сечения реактора;

- сила реакции слоя носителя

$$N = -SE\Delta V/V_0^*, \tag{2}$$

где E – модуль упругости, V_0 и V – объем недеформированного и сжатого слоя носителя соответственно, ΔV – объемная деформация ($\Delta V = V - V_0$);

- сила трения F_r уплотнения подвижного адаптера.

Условию равновесия, когда не происходит никаких реакций и нет массообмена, соответствует равенство этих сил:

$$N + F_r - mg + \langle F_r \rangle = 0, \tag{3}$$

где $\langle F_r \rangle$ – вектор силы трения, а за положительное выбрано направление тока жидкости.

* За степень набухания принимается отношение объема поглощенной полимером жидкости к объему исходного полимера [12].

* Данное соотношение является первым приближением более точной зависимости силы реакции гелеобразного полимера при его деформации [13].

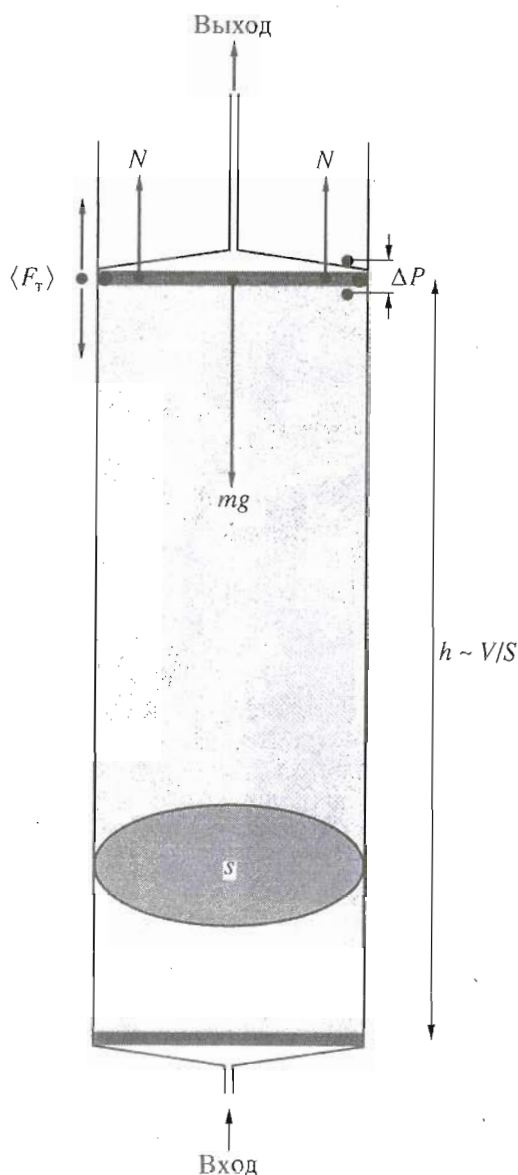


Рис. 5. Совокупность сил, действующих на подвижный адаптер ПРПО в процессе работы (пояснения см. в тексте).

Сигнал потенциметрического датчика, кинематически связанного с ПА, пропорционален величине V при условии, что в реакторе не происходит образования свободного от полимерного носителя пространства. Подставив выражение для N в уравнение (3) и сделав необходимые перестановки, можно получить следующую зависимость реально наблюдаемого объема пептидилполимера, как функцию текущих параметров процесса:

$$V = V_0 [1 - (mg - F_r - \langle F_T \rangle) / (ES)], \quad (4)$$

где именно величина V_0 (а не V) прямо пропорциональна истинной степени набухания. Для объяснения характера изменения величины V в ходе

процессов, происходящих в синтезе, рассмотрим вклад каждой составляющей уравнения (4).

В общем случае в состоянии покоя нельзя определить направление и величину F_T , которая меньше или равна силе трения страгивания ПА. Для повышения воспроизводимости метода и уменьшения гистерезисных явлений трение необходимо минимизировать, что особенно критично при малых значениях $(N + F_r - mg)$, когда большая величина F_T приводит к потере чувствительности системы мониторинга к изменениям объема.

Гидродинамическое давление на адаптер при ламинарном течении через его фильтр (что соответствует действительности, так как в данных условиях даже для наименее вязкого используемого растворителя – хлористого метилена критерий Рейнольдса $Re < 1$) пропорционально динамической вязкости и скорости потока. И поскольку в ходе процессов в ТФСП вязкость может значительно изменяться, соответственно пропорционально ей будет меняться величина F_r . Так, при прочих равных условиях увеличение вязкости протекающей жидкости приведет к уменьшению сжатия полимерного носителя и, следовательно, к увеличению объема V (поднятию адаптера). Для уменьшения таких эффектов желательнее проводить операции синтеза при минимальной экспериментально допустимой скорости потока.

Для устойчивого и эффективного функционирования ПРПО, а также для проведения корректного светлогографического мониторинга необходимо, чтобы внешняя сила сжатия mg существенно превышала силу трения и гидравлическое давление на ПА. В частности, в наших условиях величина F_T составляла 0.1 - 0.3 кгс при объемной скорости потока через ПРПО 1 - 2 мл/мин и весе груза 1 - 2 кг.

На основании всего вышеизложенного можно заключить, что сигнал потенциметрического датчика, используемый для мониторинга процессов в ТФСП, соответствует текущему объему (V) слоя пептидилполимера и отличен от величины V_0 на величину его объемной деформации при сжатии, причем сила сжатия пептидилполимера при изменяющихся в ходе синтеза внешних условиях меняется. Таким образом, корректно связывать сигнал потенциметрического датчика (и соответствующий ему объем) с состоянием пептидилполимера в ходе синтеза можно лишь при достижении системой состояния равновесия или близкого к нему, когда изменениями параметров, влияющих на положение ПА (см. уравнение 4), можно пренебречь. Поэтому использование светлогографического мониторинга, ориентированного на момент стабилизации сигнала ("платоопределение"), для организации автоматического ТФСП является вполне правомочным.

Комплексный мониторинг ТФСП

Для экспериментального подтверждения сделанных теоретических построений был осуществлен параллельный комплексный контроль за тремя изменяющимися в ходе синтеза макропараметрами системы ПРПО–пептидилполимер:

– текущим объемом слоя пептидилполимера (светлографический мониторинг);

– оптическим поглощением жидкости на выходе из реактора (спектрофотометрический мониторинг) для определения изменения концентрации реагентов и продуктов реакций в ходе синтеза;

– гидродинамическим давлением на входе в реактор (манометрический мониторинг) для определения изменения сопротивления системы (в том числе слоя пептидилполимера и адаптеров) току жидкости, пропорционального динамической вязкости и скорости течения последней.

Для удобства описания полученных результатов целесообразно разделить все операции синтетического цикла на три основных типа (которые далее будут рассматриваться отдельно):

– конденсация (реакция образования пептидной связи);

– деблокирование (реакция удаления Fmoc-защитной группы);

– вспомогательные операции (промывки пептидилполимера).

Мониторинг реакции конденсации

На рис. 6 представлена характерная картина комплексного мониторинга операции конденсации, полученная в ходе синтеза пептида (II). Характер изменения всех трех измеряемых параме-

тров ($V_{\text{отн}}$, A и ΔP) свидетельствует о параллельном протекании в ходе реакции образования пептидной связи как минимум трех основных процессов.

Во-первых, происходит усреднение в режиме рециркуляции концентрации раствора аминокислотного производного, что обуславливает осцилляцию кривых всех трех вышеуказанных параметров, причем из-за действия силы трения колебания сигнала потенциометрического датчика ПРПО, вызванные изменениями как вязкости раствора, так и степени набухания пептидилполимера в присутствии аминокислотного производного, затухают наиболее быстро.

Во-вторых, изменяется химический состав как жидкой, так и твердой фаз. Ввиду различной степени набухания исходной и конечной форм пептидилполимера на фоне изменения сольватирующей способности окружающего раствора в ходе реакции постоянно изменяется его величина V_0 .

В-третьих, возможна перестройка структуры образующегося пептидилполимера, которая может продолжаться и после завершения первых двух процессов, что в свою очередь отражается на его (пептидилполимера) степени набухания.

Поскольку набухание образующегося пептидилполимера в сильной степени зависит от природы растущей полипептидной цепи (особенно после присоединения пятого и следующих аминокислотных остатков), однозначно предсказать характер изменения объема после завершения усреднения концентрации не представляется возможным. Время, требуемое на усреднение концентрации раствора аминокислотного производного, зависит от геометрии системы. В модельных

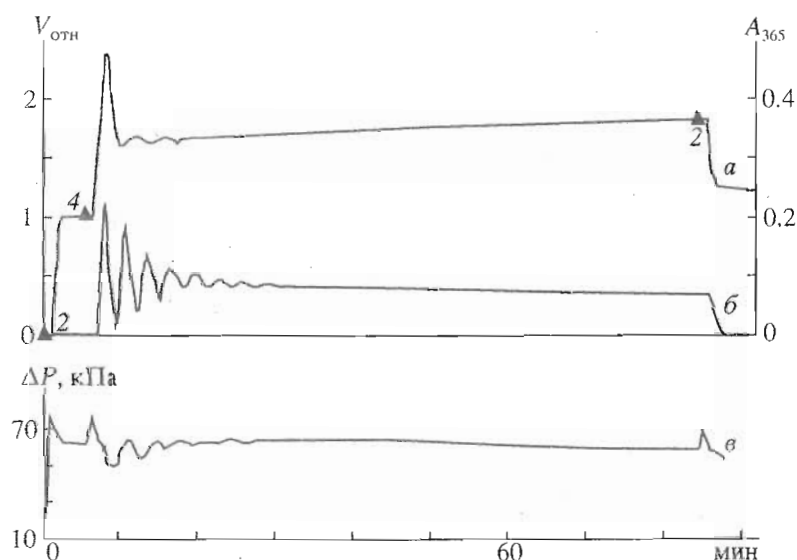


Рис. 6. Комплексный мониторинг реакции присоединения Fmoc-Ala в виде 1-гидроксибензотриазолового эфира к AlaTyr(tBu)Gly-полимеру в синтезе пептида (II). Кривая *a* – объем пептидилполимера ($V_{\text{отн}}$); *b* – поглощение (A); *в* – давление. Обозначения и масштаб $V_{\text{отн}}$ – см. подпись к рис. 2.

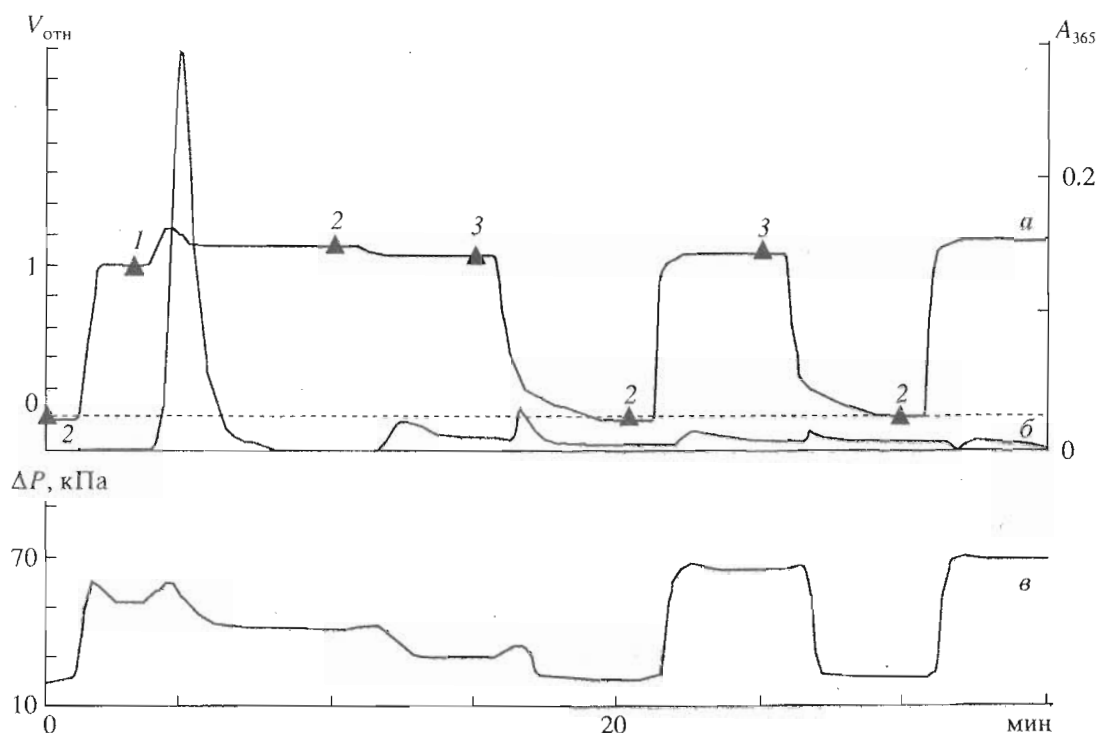


Рис. 7. Комплексный мониторинг реакции удаления Fmoc-группы с Fmoc-GlyGlu(OtBu)AsnHis(Trt)Arg(Mtr)-полимера в синтезе пептида (III). Обозначения кривых – см. подпись к рис. 6, точек 1, 2, 3 – см. подпись к рис. 2. Масштаб $V_{отн}$: за единицу принят объем исходного пептидполимера в DMF, за ноль – в *t*BuOH/DMF (3 : 1) перед началом операции деблокирования.

синтезах различных пептидов с использованием комплекса “СинХром” оно составляло 20 - 35 мин, в то время как наблюдавшееся в ходе отдельных реакций конденсации изменение объема пептидполимера продолжалось и после 2 - 2.5 ч от ее начала (несмотря на то что в ряде случаев нингидриновый тест давал отрицательную реакцию). Отсюда следует, что делать однозначные выводы о связи динамики изменения объема пептидполимера с ходом какого-либо одного процесса, будь то степень завершения реакции конденсации или изменение конформации пептидполимера, не представляется возможным. Это касается, в частности, попытки определения развития агрегационных явлений в ходе реакции конденсации (“real-time detection”) с использованием светлогографического мониторинга [14]. Поэтому длительность операции конденсации при автоматическом синтезе заранее приходится задавать жестко по времени.

Мониторинг реакции деблокирования и вспомогательных операций

На рис. 7 представлена картина комплексного мониторинга двух типов операций синтетического цикла (деблокирования и отмывок), полученная в ходе синтеза пептида (III). Очевидно, что удаление защитной Fmoc-группы представляет

собой более простой процесс (по сравнению с реакцией конденсации), результат прохождения которого может быть однозначно интерпретирован. Во-первых, реакция проходит без рециркуляции потока реагента и состав жидкой фазы на входе в реактор всегда постоянен. Во-вторых, в используемой деблокирующей смеси, как показали наши многочисленные эксперименты, степень набухания исходной формы пептидполимера всегда больше, чем в чистом DMF (в котором находится пептидполимер перед началом деблокирования).

Параллельный контроль по оптическому поглощению за вымыванием продуктов реакции деблокирования показал, что к моменту начала стабилизации сигнала потенциметрического датчика ($V_{отн}$) из реактора уже удалено не менее 85 - 90% фульвен-пиперидинового аддукта, а с учетом задержки – T_3^2 (см. выше) к моменту перехода к следующей операции можно говорить о полном завершении процесса деблокирования.

Использование далее чередующихся контрастных промывок позволило дополнительно отмыть остаточные количества продуктов реакции деблокирования, составившие, по данным спектрофотометрического мониторинга, интегрально не менее 40% от площади основного пика. С учетом сделанного ранее определения чувствительности

свеллографического мониторинга (см. рис. 1) можно приближенно оценить вероятное остаточное количество деблокирующей смеси как $1 \times 10^{-2}\%$ от исходного после однократного акта сжатия/набухания и $1 \times 10^{-6}\%$ после повторного.

Как уже отмечалось, степень набухания пептидилполимера зависит от его химического состава. При изменении последнего в ходе реакции деблокирования должна меняться и степень набухания. Не делая заключений о корреляции кинетики этой реакции с изменением объема слоя пептидилполимера, можно тем не менее адекватно связать момент стабилизации сигнала потенциометрического датчика с достижением пептидилполимером состояния равновесия. В данных условиях (постоянный и одинаковый состав жидкой фазы на входе и выходе из реактора) это фактически означает завершение реакции.

На рис. 8 приведены кривые параллельного свеллографического и спектрофотометрического мониторинга последовательных реакций деблокирования в синтезе "трудной" последовательности (II)*. Затруднение реакции деблокирования по мере роста полипептидной цепи, приводящее к увеличению общего времени прохождения реакции, соответственно отражалось в увеличении времени достижения момента стабилизации объема пептидилполимера (свеллографический мониторинг). Полученные результаты коррелировали с данными спектрофотометрического мониторинга**.

Хотя исходно и предполагалось длительность операции деблокирования задавать жестко по времени, данные комплексного мониторинга доказали правомерность использования на данной стадии синтеза автоматической коррекции длительности процесса по обратной связи от потенциометрического датчика ПРПО.

Автоматическая оптимизация расхода реагентов в ходе ТФСП

При работе комплекса "СинХром" в режиме ТФСП с использованием обратной связи происходит автоматическая оптимизация расходов реагентов и растворителей на каждой операции синтетического цикла, а также длительности этих операций. На практике в синтезе коротких и средней длины пептидов (до 20 аминокислотных остатков) это приводит к значительной экономии затрат времени и реактивов. Анализ расходов в автоматическом синтезе ряда пептидов (см. перечень последовательностей в табл. 1) на комплекс-

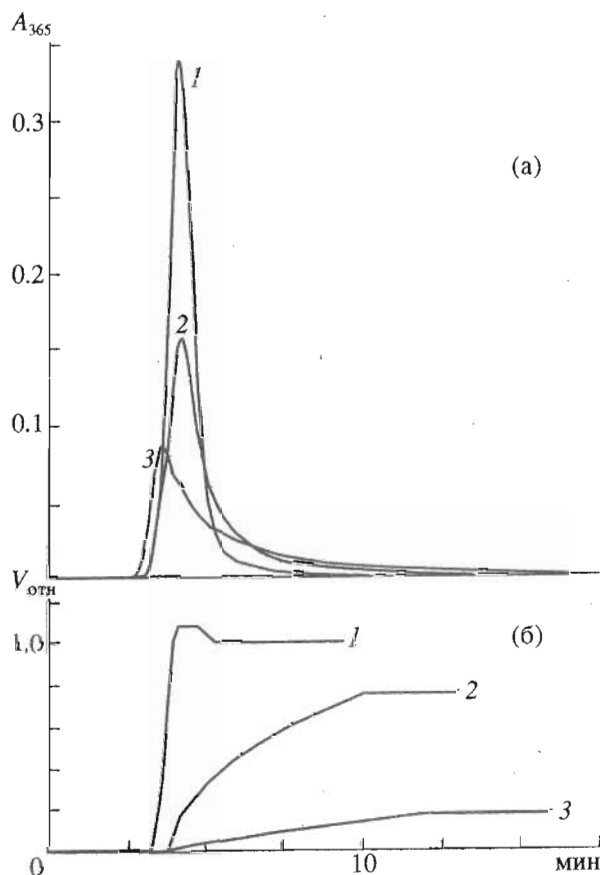


Рис. 8. Комплексный спектрофотометрический (а) и свеллографический (б) мониторинг реакций удаления Fmoc-группы в процессе синтеза пептида (II). Показано деблокирование: 1 - Fmoc-Thr(tBu)AlaAla-Thr(tBu)Gly-полимера, 2 - Fmoc-AlaThr(tBu)AlaAla-Thr(tBu)Gly-полимера, 3 - Fmoc-AlaAlaThr(tBu)AlaAlaThr(tBu)Gly-полимера. Масштаб $V_{отн}$: за ноль принят объем Fmoc-пептидилполимера в DMF перед началом операции деблокирования, за единицу - объем после деблокирования Thr(tBu)AlaAlaThr(tBu)Gly-полимера (в деблокирующей смеси). Счет времени - с момента начала подачи смеси пиперидин/DMF/толуол (6 : 7 : 7).

се "СинХром" показал их экономию в среднем в 3 - 5 раз по сравнению с протоколами синтеза для таких широко используемых синтезаторов, как MilliGen/Bioscience 9500 и 9600. В отдельных случаях, например в синтезе пептида (IV), суммарный расход был меньше на порядок, а средний расход на один цикл составил 84 мл растворителей и реагентов.

ЖИДКОСТНАЯ КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Как отмечалось в первой части данной работы [1], ПРПО можно использовать и в качестве колонки для ЖКХ. Проводимые ранее исследования эффективности хроматографического

* Потенциалы агрегации для аминокислот данного пептида [15] свидетельствуют о склонности растущего фрагмента к агрегации в ходе синтеза.

** Согласно данным Шепарда и сотр. [16], в случае агрегации наблюдается уширение пиков поглощения продуктов деблокирования.

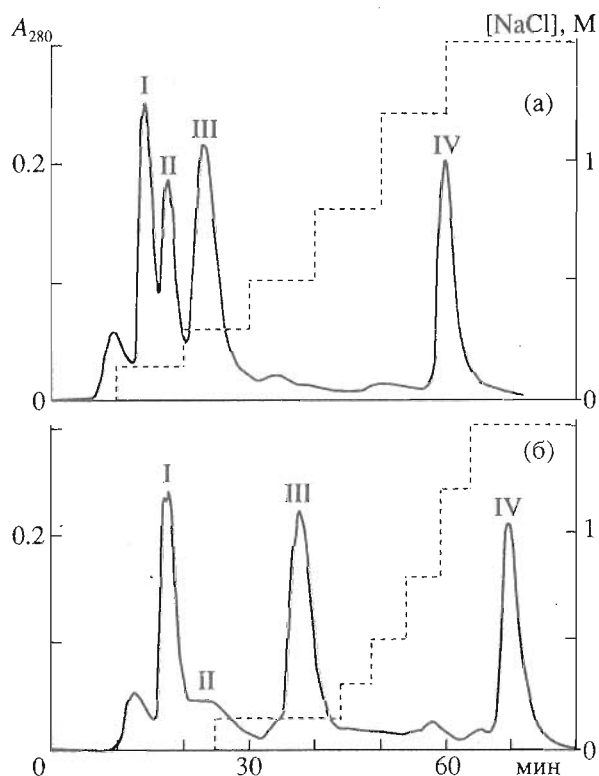


Рис. 9. Хроматография смеси фосфолипазы A_2 , апамина и мелиттина из яда пчелы *Apis mellifera* на катионообменном сорбенте SP-Тоуорепарл 650М. Условия разделения: скорость потока 1 мл/мин, стартовый буфер – 50 мМ ацетат аммония, pH 9.0, элюция – ступенчатым повышением концентрации NaCl в стартовом буфере по времени (а) и с коррекцией по сигналу обратной связи (б). Образец – 1.6 мг фосфолипазы A_2 , 10 мг апамина, 1 мг мелиттина в 1 мл стартового буфера. I, II – изоформы фосфолипазы A_2 , III – апамин, IV – мелиттин. Сплошные линии – профиль поглощения, пунктирные – градиент ионной силы.

разделения на нежестком ионообменном сорбенте с использованием модифицированной по типу ПРПО колонки [17] продемонстрировали существенное улучшение степени разрешения хроматографических зон при контролируемом внешнем сжатии слоя насадки.

Кроме того, наличие в комплексе “СинХром” возможности обработки в реальном времени сигнала обратной связи позволяет проводить оптимизацию профиля ступенчатого градиента элюции в рабочем режиме по сигналу детектирующей системы. Для демонстрации возможностей такого принципа оптимизации были поставлены модельные эксперименты по разделению смеси полипептидных компонентов яда пчелы. На рис. 9а представлен профиль разделения смеси на катионообменном сорбенте SP-Тоуорепарл 650М с использованием ПРПО в качестве хроматографической колонки. В данном случае ступенчатый градиент ионной силы (пунктирная линия) формировался управляющим модулем жестко по вре-

мени. На рис. 9б приведен профиль элюции этой же смеси, полученный при автоматической оптимизации градиента ионной силы. Оптимизация в режиме “on-line” проводилась по моментам стабилизации сигнала спектрофотометра так, что управляющий модуль выдавал команду на начало элюции следующим буфером после приближения сигнала к уровню базовой линии. Для того чтобы система успела отреагировать на изменение элюотропной силы элюента (по аналогии с режимом ТФСР), были использованы соответствующие временные задержки T_3^1 и T_3^2 . По результатам сравнения этих двух профилей можно отметить, что, если разрешение первой пары пиков (I и II), элюирующихся со стартовым буфером и содержащих изоформы фосфолипазы A_2 , изменилось незначительно (с 0.9 до 1.1), то степень разрешения следующей пары (фосфолипаза A_2 – пик II и апамин – пик III) увеличилась с 0.9 до 1.8 при неухудшившихся показателях разрешения апамина и мелиттина (пики III и IV). При этом общее время процесса увеличилось только на 15%.

В заключение отметим, что особую актуальность подобный способ оптимизации имеет в случае масштабирования ЖКХ для препаративных и пилотных разделений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Автоматический синтез пептидов и ЖКХ проводили с использованием комплекса “СинХром” (НПО “СинХро”, Россия). Спектрофотометрический мониторинг осуществляли с использованием Uvicord SP (LKB, Швеция). Для проведения манометрического мониторинга использовали проточный тензопреобразователь Д2, 5Б (ПО “Промприбор”, Россия).

Аналитическую ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа System Gold (Beckman, США) на колонках (4.1 × 250 мм) Nucleosil 300-7 C18 и C4 (Macherey Nagel, ФРГ). Элюцию осуществляли линейным градиентом ацетонитрила (2%/мин) в 0.1% TFA либо в 50 мМ NaH_2PO_4 (pH 4.5). Детекцию по поглощению проводили при длине волны 220 нм с количественным обчетом по площадям пиков на интеграторе Chromatopac C-R6A (Shimadzu, Япония).

Аминокислотный состав пептидов определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе (Biotronic LC5000, ФРГ) после кислотного гидролиза (6 н. HCl, 110°C, 24 ч).

В работе использовали аминокислотные производные и реактивы фирм Novabiochem (Швейцария), Fluka (Швейцария), LKB Biochrom (Великобритания), Sigma (США). Очистка растворителей проводилась стандартными методами [18].

Пептиды были синтезированы твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии по

разработанным нами протоколом (табл. 2). В качестве исходных носителей применялись *n*-(гидроксиметил)фенилоксиметилполимер и (для пептида (I)) 4-(2',4'-диметоксифенил-*Fmoc*-аминометил)феноксиполимер (Novabiochem) на основе сополимера 1% дивинилбензола со стиролом. Для модельного эксперимента по определению чувствительности свеллографического мониторинга был взят сополимер стирола с 1% дивинилбензола Bio-Beads S-X1, 200 - 400 меш (Bio-Rad Laboratories, США).

В качестве боковых защитных групп использовались: *t*Bu – для Glu, Ser, Thr и Tyr; Boc – для Lys; Mtr – для Arg; Trt – для Cys и His.

Для конденсаций использовались пентафторфениловые эфиры *Fmoc*-Asp, *Fmoc*-Cys(Trt), *Fmoc*-Gln и *Fmoc*-His(Trt) в присутствии *HOBT* (1 экв.); остальные аминокислотные остатки вводились в реакцию в виде 1-гидроксibenзотриазоловых эфиров, полученных *in situ* (по 1 экв. аминокислотного производного, диизопропилкарбодиимида и *HOBT*, перемешивание в DMF 10 мин).

Конечное деблокирование пептидов. Удаление боковых защитных групп и отщепление пептидов от полимерного носителя проводили трифторуксусной кислотой (40 мл/г пептидилполимера) в присутствии сквендженеров: 5% воды – для пептида (II) (время деблокирования 1.5 ч при комнатной температуре); 5% этандитиола – для пептида (IV) (1.5 ч); 5% анизола и 1% этандитиола – для пептидов (I), (III) (8 ч). Полимерный носитель отфильтровывали, промывали деблокирующей смесью (2 × 10 мл), полученный раствор упаривали на ротаторном 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 (Toyosoda, Япония) в 0.1 М уксусной кислоте при скорости элюции 90 мл/ч. Детекцию по поглощению осуществляли при длинах волн 226 и 280 нм, элюат фракционировали по времени. Фракции, содержащие преимущественно целевой продукт (по данным ВЭЖХ), объединяли и лиофилизировали.

При необходимости проводили дополнительную очистку препаратов ионообменной ЖХХ (пептид (I)) с использованием ПРПО (1.6 × 4.5 см) в качестве колонки на сорбенте SP-Toyopearl 650M (Toyosoda, Япония) в фосфатно-солевых буферных системах с последующим обессоливанием на колонке Sephadex G-15 (2.5 × 80 см) в 0.2 М уксусной кислоте.

Таблица 3. Выход и чистота синтезированных пептидов

Пептид	Выход, %		Чистота по данным ВЭЖХ, %	<i>R_t</i> , мин
	после гель-фильтрации	конечный		
(I)	81	49	(69*)95	17.4
(II)	70	70	85	20.9
(III)	87	87	97	8.9
(IV)	74	74	93	11.8

* После гель-фильтрации.

Полученные продукты с чистотой 95 - 99.5% (по данным аналитической ВЭЖХ) охарактеризованы корректными данными аминокислотного анализа. Качественная характеристика полученных продуктов приведена в табл. 3.

Авторы выражают благодарность акад. В.Т. Иванову (ИБХ РАН) за ценные замечания, высказанные при обсуждении данной работы, а также Л.Ф. Марковой и канд. хим. наук Т.А. Мурановой (Филиал ИБХ РАН) – за проведение аминокислотных анализов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бару М.Б., Черский В.В., Данилов А.В., Моисиников С.А., Мустаева Л.Г. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. № 7. С. 498 - 505.
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. 4, 668, 476 (США), 1987. С. 31.
3. Проспект фирмы Biotronic (ФРГ). Synostat P. Peptide Synthesizer. 1988. С. 20.
4. Проспект фирмы Biosearch. A New Brunswick Scientific Company (США). Biosearch Model 9500 Peptide Synthesizer. Operator's Guide, 1st. ed., 1988.
5. Проспект фирмы LKB Biochrom Ltd. (Великобритания). LKB Biolyux 4170 Instruction Manual, 1986.
6. Gausepohl H., Kraft M., Boulin C., Frank R.W. // Peptides 1990. Proc. 21st European Pept. Symp. / Eds Giralt E., Andreu D. Leiden: ESCOM Science Publishers B.V., 1991. P. 206 - 207.
7. Fox J.E., Newton R., Stroud C.H. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1991. V. 38. P. 62 - 65.
8. Nokihara K., Yamamoto R., Hazama M., Wakizawa O., Nakamura S. // Proc. 2nd Int. Symp. Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis / Ed. Epton R. Andover: Intersept Limited, 1992. P. 259 - 266.
9. Бару М.Б., Родионов И.Л., Шестаковский Л.Я., Ларин В.Т. Способ управления процессом твердофазного синтеза биополимеров: А. с. 1744087 СССР // 1992, № 24. С. 5.
10. Baru M.B., Peschenko I.A., Rodionova L.N., Rodionov I.L. // Peptide Chemistry 1992. Proc. 2nd Japan Symp. on Peptide Chemistry / Ed. Yanaiharu N. Leiden: ESCOM Science Publishers B.V., 1993. P. 116 - 118.

11. *Baru M.B., Ivanov V.T., Rodionov I.L.* // Peptides 1990. Proc. 21st European Pept. Symp. / Eds Giralt E., Andreu D. Leiden: ESCOM Science Publishers B.V., 1991. P. 198 - 199.
12. Энциклопедия полимеров. Т. 2 / Ред. В.А. Кабанов. М.: Сов. энциклопедия, 1974. С. 317.
13. Энциклопедия полимеров. Т. 3 / Ред. В.А. Кабанов. М.: Сов. энциклопедия, 1974. С. 559.
14. *Rodionov I.L., Peshenko I.A., Mustaeva L.G., Ivanov V.T.* // Proc. 3rd Int. Symp. Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis / Ed. Epton R. Andover: Intersept Limited, 1994. In Press.
15. *Krchnak V., Vagner J.* // Proc. 2nd Int. Symp. Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis / Ed. Epton R. Andover: Intersept Limited, 1992. P. 419 - 424.
16. *Bedford J., Hyde C., Johnson T., Jun W., Owen D., Quibell M., Sheppard R.C.* // Int. J. Peptide and Protein Res. 1992. V. 40. P. 300 - 307.
17. *Baru M.B., Kozlovsky-Vagenina I.V.* // J. Chromatogr. A. 1993. V. 657. № 1, P. 199 - 203.
18. *Perrin D.D., Armarego W.L.F., Perrin D.R.* // Purification of Laboratory Chemicals. N.Y.: Pergamon Press, 1985. P. 167, 168, 224, 445 - 448.

Automatic SynChrom System for Solid Phase Peptide Synthesis and Liquid Column Chromatography.

Part II.* Application to Solid Phase Peptide Synthesis and Liquid Column Chromatography

M. B. Baru[#], V. V. Cherskii¹, A. V. Danilov, S. A. Moshnikov, and L. G. Mustaeva

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

¹*SynChro NPO, Pushchino, Moscow oblast', 142292 Russia*

Abstract – Automatic solid phase peptide synthesis using the SynChrom system is described. Problems of swellographic monitoring are discussed. Combined monitoring (swellographic, spectrophotometric, and manometric) of all steps of the synthetic cycle are suggested. Potential applications of the system to liquid column chromatography were demonstrated.

Key words: solid phase peptide synthesis, automatic synthesizer, liquid column chromatography, continuous-flow reactor with variable volume, swellographic, spectrophotometric, and manometric monitoring.

* For Part I see [1].

[#] To whom correspondence should be addressed.