



УДК 616.891:547.466.96.057

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ β -АМИЛОИДА-(1–42)© 1997 г. М. В. Сидорова[#], А. С. Молокоедов, М. В. Овчинников,
Ж. Д. Беспалова, В. Н. Бушуев

Кардиологический научный центр РАМН, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15-а

Поступила в редакцию 15.04.96 г.

С использованием Fmoc-схемы осуществлен твердофазный синтез полипептида, соответствующего последовательности 1–42 β -амилоида – белка, накапливающегося в клетках мозга при болезни Альцгеймера. Проведена сравнительная оценка двух альтернативных подходов к синтезу – ступенчатого наращивания пептидной цепи и фрагментной конденсации – и показано преимущество последнего. Изучено влияние различных факторов (растворителя, реагента для деблокирования α -аминогрупп, степени замещения полимерного носителя) на результаты синтеза. Подобраны условия ВЭЖХ, пригодные для аналитического контроля гомогенности пептида β A4-(1–42), а также условия гель-хроматографии на сефадексе G-50, обеспечивающие получение целевого продукта 90–95% чистоты по данным ВЭЖХ.

Ключевые слова: β -амилоид-(1–42), болезнь Альцгеймера, “сложная последовательность”, твердофазный пептидный синтез, фрагментная конденсация, ВЭЖХ.

Одним из характерных признаков болезни Альцгеймера – нейропсихического заболевания, обусловленного дегенерацией областей мозга, управляющих памятью и эмоциями, является накопление и агрегация в клетках мозга β -амилоида (β A4) [1]. β -Амилоидом названа фракция пептидов, образующихся при протеолитическом расщеплении белка-предшественника (APP) [2, 3] и соответствующих фрагментам 1–39, 1–40, 1–42 и 1–43 представленной на рис. 1 аминокислотной последовательности.

Причины болезни Альцгеймера до сих пор неясны. В медико-биологических экспериментах, связанных с ее изучением, применяются синтетические пептидные фрагменты β -амилоида [4, 5], получение которых представляет довольно трудную задачу. В литературе имеется несколько сообщений о более или менее удачных попытках синтеза и очистки β -амилоида [3, 6, 7]. Показано, что β -амилоидные полипептиды относятся к сложным для твердофазного синтеза объектам и их получение сопряжено с решением по меньшей мере

двух проблем. Во-первых, синтез пептидов, соответствующих последовательности С-концевого высокогидрофобного фрагмента, сопровождается межмолекулярной агрегацией растущих на полимере пептидных цепей в органических растворителях [8]. Агрегация, обусловленная, по-видимому, образованием вторичной β -складчатой структуры, приводит к существенному снижению выходов реакций ацилирования и образованию “ложных” (с пропусками отдельных аминокислотных остатков) пептидов, трудноотделимых от целевого продукта [9]. Во-вторых, крайне низкая растворимость пептида β A4 и его склонность к агрегации в водных растворах существенно осложняют его анализ и очистку по окончании синтеза [7, 10].

Наша работа посвящена поиску оптимальных условий твердофазного синтеза наиболее гидрофобного из β -амилоидных пептидов – пептида β A4-(1–42) (далее – β A4) и изучению подходов к его анализу и очистке.

Как отмечалось выше, С-концевая последовательность синтезируемого пептида характеризуется высокой склонностью к агрегации за счет образования межмолекулярных водородных связей. Показано, что водонерастворимые пептиды β A4-(34–42) [4] и β A4-(29–42) [10] образуют антипараллельную β -структуру. Существует также предположение, что способность С-концевого фрагмента молекулы образовывать необычно стабильную β -структуру – основная причина крайне низкой растворимости всего белка и агрегации β -амилоида в амилоидных бляшках [4, 10]. Потенциалы агрегации для молекулы пептида β A4

Использованы сокращения, рекомендованные комиссией IUPAC-IUB (Eur. J. Biochem. 1984, V. 183, P. 9–37), а также: BOP – (бензотриазол-2-илокси)трис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат, DCM – дихлорметан, DBU – 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен, EDT – 1,2-этандитиол, ESI-MS – масс-спектрометрия с электроспреейной ионизацией, Fmoc – 9-флуоренилдиметилкарбонил, DIEA – диизопропилэтиламин, DIC – N,N-диизопропилкарбодимид, HOBt – 1-гидроксибензотриазол, HONSu – N-гидроксисукцинимид, Mtr – 4-метокси-2,3,6-триметилфенилсульфонил, NMP – N-метилпирролидон, Pmc – 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил, TFE – трифторэтанол.

[#] Автор для переписки.

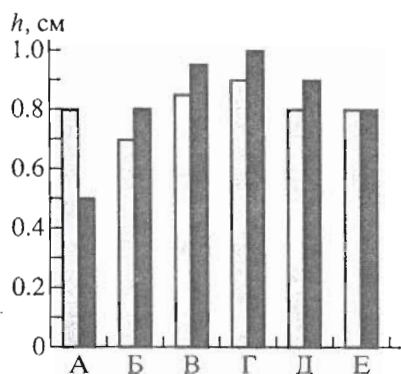


Рис. 3. Набухание пептидполимеров Н-Val-Val-Ile-Ala- P и Н-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala- P (светлые и темные столбцы соответственно) в различных растворителях (определяли по высоте столбика смолы в узком стеклянном сосуде после 5-кратной промывки соответствующим растворителем: DCM-TFE, 1 : 1 (А), DMF (Б), NMP (В), DMF-NMP, 1 : 1 (Г), NMP-DMSO, 9 : 1 (Д), DCM-NMP-DMF, 1 : 1 : 1 (Е).

получены для смесей DMF-NMP (3 : 1 и 1 : 1). Поэтому как в ступенчатом, так и во фрагментном вариантах твердофазного синтеза все операции (деблокирование, ацилирование и промывки) проводились в этих смесях.

По окончании твердофазного синтеза пептид отщеплялся от полимера смесью 82.5% TFA, 5% фенола, 5% H_2O , 5% тиоанизола, 2.5% EDT [18]. Для анализа полученных соединений мы применяли масс-спектрометрию и ВЭЖХ в специально подобранных условиях, о чем будет сказано ниже.

В рамках ступенчатого синтеза пептида βA4 мы варьировали некоторые параметры. Так, пептидполимеры в первых 14 циклах синтеза деблокировали либо 20% раствором пиперидина в DMF-NMP, либо раствором 2% DBU и 2% пиперидина в DMF-NMP (DBU иногда применяется

для отщепления Fmoc-группы в синтезе сложных пептидов [16]). При этом качество конечного продукта синтеза (по данным ВЭЖХ и ESI-MS) не зависело от применяемого деблокирующего реагента. Мы использовали разные защитные группировки для гуанидиновой функции аргинина. В случае применения Mtg-защиты деблокирование конечного продукта требовало более длительного, чем обычно, времени – 18–24 ч (судя по данным ВЭЖХ), а при использовании более лабильной Fmoc-группы – 3–5 ч. Fmoc-аспарагин и Fmoc-глутамин вводили в пептидную цепь либо через соответствующие активированные 4-нитрофениловые эфиры в присутствии HOBT (2 \times 2 ч), либо конденсацией Tgt-защитенных по амидной функции производных с помощью BOP (2 \times 50 мин); в обоих случаях мы получили одинаковые результаты.

Как и следовало ожидать, на качество целевого продукта влияло содержание стартовой аминокислоты на полимере. Продукт, синтезированный на смоле со степенью замещения Fmoc-аланином 0.45 ммоль/г, содержал больше примесей “ложных” пептидов, чем вещество, полученное на носителе с содержанием стартовой аминокислоты 0.20–0.22 ммоль/г (соответствующие масс-спектры представлены на рис. 4а, 4б). Содержание целевого вещества в сырых продуктах твердофазного синтеза было достаточно высоким (табл. 1), а выходы в расчете на стартовую аминокислоту в различных экспериментах колебались незначительно (от 45 до 50%). Продукты, полученные на Fmoc-Ala-полимере с исходной степенью замещения 0.2 ммоль/г, при проведении синтеза в смеси DMF-NMP (3 : 1) содержали примеси веществ с молекулярными массами, соответствующими пептидам с пропусками остатка серина ($M - 87$) и фрагмента Asp-Ser ($M - 202$) (на рис. 4 ΔS и ΔDS соответственно). Кроме этого в них была найдена примесь соединения с большей молекулярной массой ($M + 57$), по-видимому, соответствующая

Таблица 1. Результаты твердофазного синтеза пептида βA4 -(1–42) на Fmoc-Ala-полимере

Номер синтеза*	Степень замещения полимера, ммоль/г	Содержание целевого вещества, ВЭЖХ, %		Выход, %**	ESI-MS, M (Da) \pm 0.01%
		до очистки	после очистки		
1	0.20	70.3	91.0	50.1	4514.8 (βA4); примеси: 4571.4 (+Bu ^t), 4426.1 (ΔSer), 4312.4 (ΔAspSer)
2	0.22	74.5	94.9	48.8	4515.2 (βA4), 4552.9 (+K ⁺); примеси: 4311.5 (ΔAspSer)
3	0.45	71.1	92.0	44.5	4514.9 (βA4); примеси: 4570.1 (+Bu ^t), 4358.9 (ΔArg) или (ΔValGly), 4428.0 (ΔSer), 4313.4 (ΔAspSer)
4	0.20	83.8	95.0	48.2	4515.3 (βA4); примеси: 4571.7 (+Bu ^t)

* Синтезы со ступенчатым наращиванием пептидной цепи (синтезы 1–3) и фрагментной конденсацией (4) осуществлены в смеси DMF-NMP, 1 : 1 (синтезы 2–4) и 3 : 1 (1).

** Выходы приведены в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру.

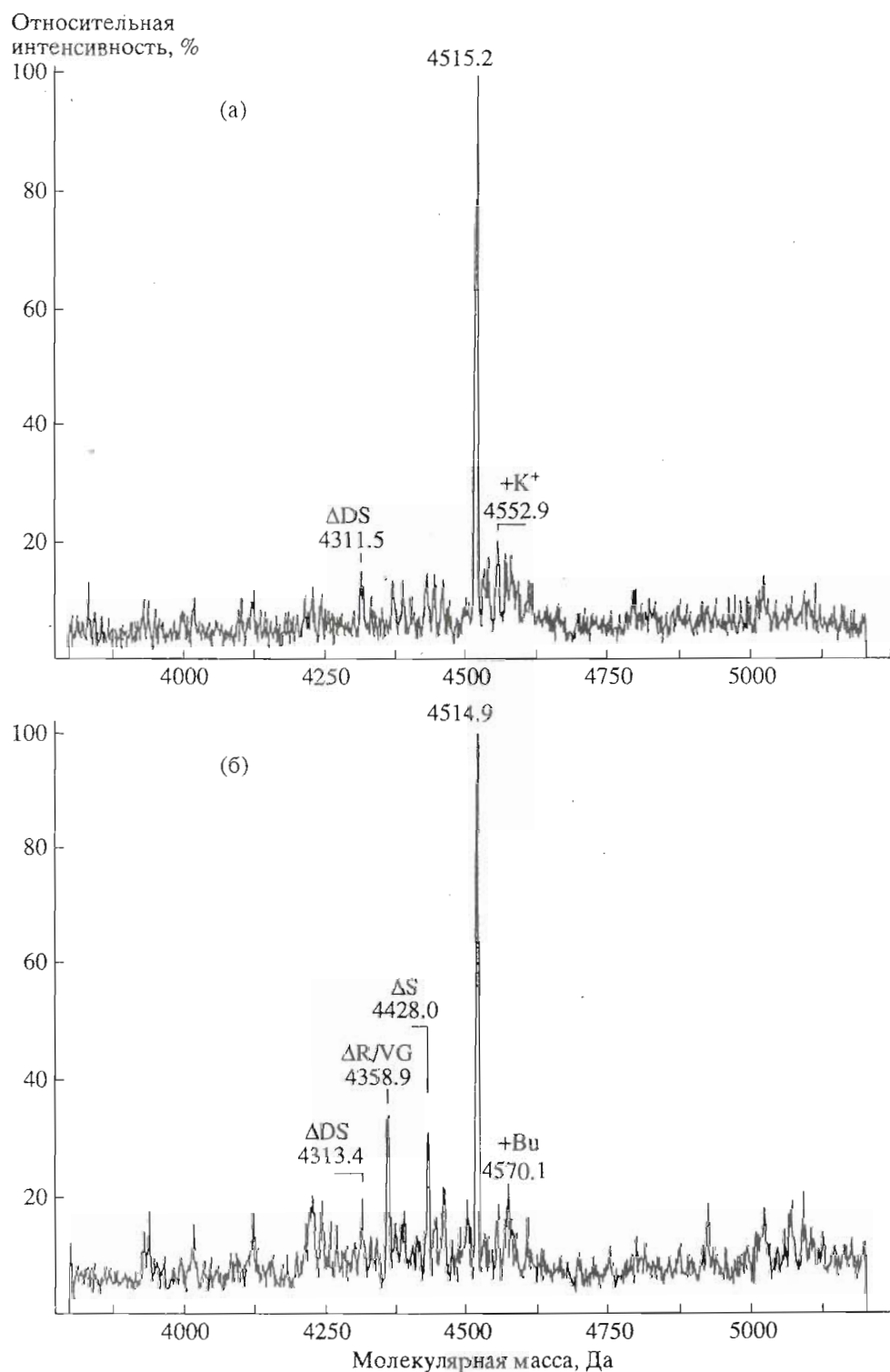


Рис. 4. Масс-спектры пептида β -A4-(1-42), полученного ступенчатым синтезом на полимере со степенью замещения 0.22 (а), 0.45 ммоль/г (б) в смеси растворителей DMF-NMP (1 : 1) и фрагментной конденсацией (в). Символом Δ обозначены вариации целевого пептида с пропусками соответствующих аминокислот (в однобуквенном коде). Расчетная молекулярная масса целевого пептида 4514.1 Да. Ошибка измерения величины молекулярной массы $\pm 0.01\%$.

целевому пептиду, модифицированному *трет*-бутильным остатком. При наличии в аминокислотной цепи остатков метионина и тирозина, легко подвергающихся модификации *трет*-бутил-ка-

тионами в ходе заключительного деблокирования [19], образование такого побочного продукта весьма вероятно. Пептид, полученный на смоле со степенью замещения 0.45 ммоль/г, помимо

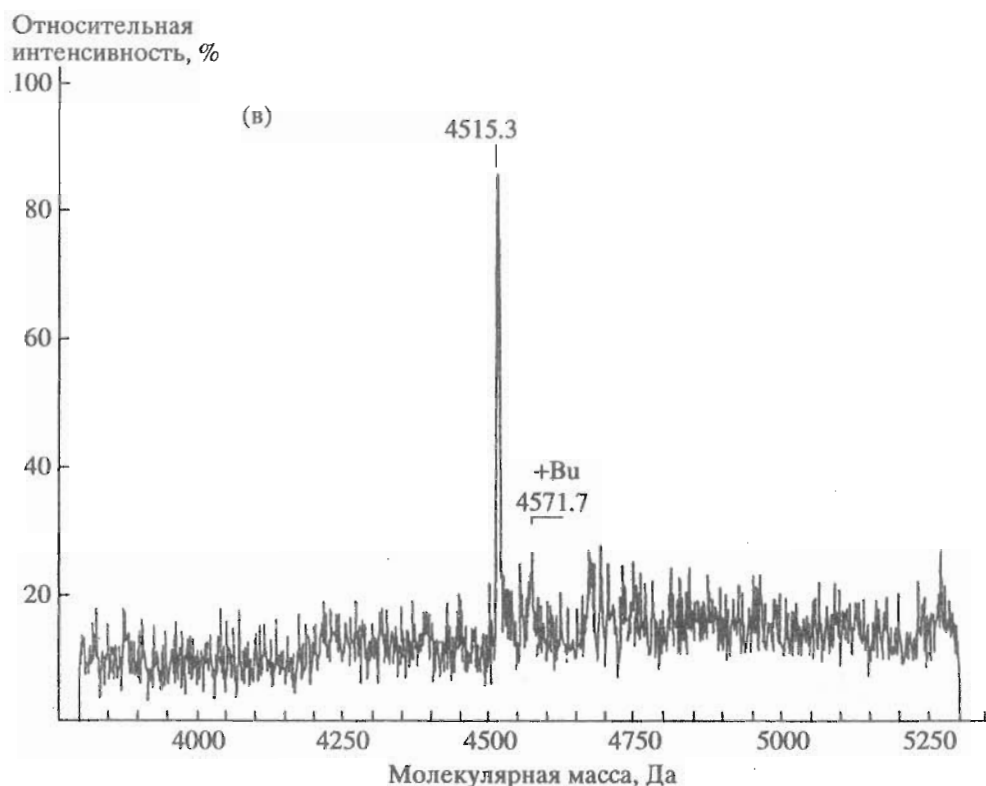


Рис. 4. Окончание.

указанных содержал примесь вещества с молекулярной массой ($M - 156$), соответствующей пептиду с пропуском фрагмента $-Val-Gly-$ или остатка аргинина ($\Delta VG/R$ на рис. 4б). Лучшие результаты были получены при проведении синтеза в смеси DMF-NMP (1 : 1) на Fmoc-Ala-полимере с нагрузкой 0.22 ммоль/г. В этом случае продукт был практически свободен от примесей "ложных" пептидов (см. масс-спектр на рис. 4а и оп. 2 в табл. 1).

Для фрагментного варианта синтеза С-концевая, наиболее трудная для синтеза последовательность пептида $\beta A4$ была разбита на пептидные блоки (см. рис. 1), которые, как правило, еще сохраняют высокую реакционную способность, сравнимую с реакционной способностью отдельных защищенных аминокислот [20]. Кроме того, N-концевой пентапептид был присоединен в виде фрагмента с незащищенным аргинином, остальные аминокислоты конденсировали так же, как в ступенчатом варианте синтеза. Фрагментация пептидной цепи по остаткам глицина традиционна. При выборе фрагмента с С-концевым остатком аргинина мы руководствовались результатами собственных разработок, согласно которым конденсация подобных блоков в растворе протекает с высокими выходами и без рацемизации [21]. При выборе размера пептидного блока мы учитывали также данные работы [6] о твердофазно-фрагментном синтезе пептида $\beta A4$, в которой выходы конденсации октапептид-

ных фрагментов были невысоки (70–90%), а выходы конденсации более длинных фрагментов неудовлетворительны.

Пептидные фрагменты Fmoc-Leu-Met-Val-Gly-OH (F1), Fmoc-Ala-Ile-Ile-Gly-OH (F2), Fmoc-Ser(Bu^t)-Asn-Lys(Boc)-Gly-OH (F3), Fmoc-Ala-Glu(OBu^t)-Asp(OBu^t)-Val-Gly-OH (F4), Fmoc-Asp(OBu^t)-Ala-Glu(OBu^t)-Phe-Arg-OH (F5) были синтезированы классическими методами в растворе путем наращивания аминокислотной цепи по одной аминокислоте с С-конца. Для временного блокирования α -аминогрупп применялась Z-защита, которая в дальнейшем удалялась каталитическим гидрогенолизом. Для защиты ω -карбоксильных функций аспарагиновой и глутаминовой кислот и гидроксильной функции серина использовались *tert*-бутиловые эфиры, а для ϵ -аминогруппы лизина – Вос-группа. При синтезе фрагментов F1–F4 карбоксильные группы остатков глицина защищали солеобразованием, а для создания амидной связи применяли активированные N-гидрокси-сукцинимидные или 4-нитрофениловые эфиры в органической или водно-органической среде.

На рис. 5 приведена типовая схема синтеза фрагментов F1–F4. Промежуточные защищенные пептиды очищали перекристаллизацией из подходящих растворителей или адсорбционной хроматографией на силикагеле и характеризовали данными ТСХ и ¹H-ЯМР-спектроскопии. После

удаления Z-группы на заключительном этапе синтеза указанных фрагментов их анализировали и при необходимости очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ до степени чистоты >95%, затем вводили N^α-Fmoc-защиту действием Fmoc-ONSu в водных диоксане или ацетонитриле и кристаллизовали. Синтез фрагмента F5 с C-концевым остатком аргинина проводили в соответствии с ранее описанными для получения подобных пептидов

методиками [21]. 4-Нитрофениловые эфиры соответствующих Z-аминокислот и Fmoc-Asp(OBu')-ONr присоединяли к аминокомпонентам с незащищенным аргинином в безводном DMF и полученные пептиды хроматографировали на силикагеле. Гомогенность пептидных фрагментов F1-F5 подтверждена данными ТСХ и ВЭЖХ, а их структура – масс-спектрометрией и ¹H-ЯМР-спектроскопией (табл. 2, 3).

Таблица 2. Данные масс-спектрометрии пептидных фрагментов

$M_{расч}$, Да	F1	F2	F3	F4	F5
	640.8	594.7	782.9	823.9	971.1
ESI-MS, m/z	641.5 [M + H] ⁺	595.4 [M + H] ⁺	783.7 [M + H] ⁺ 821.7 [M + K] ⁺	824.7 [M + H] ⁺ 846.6 [M + Na] ⁺	971.8 [M + H] ⁺

Таблица 3. Химические сдвиги δ (м. д.) амидных и алифатических протонов в пептидных фрагментах*

Пептид Остаток	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	Примечание
Fmoc-L-M-V-G-OH						
Leu 1	7.540	4.057	1.425, 1.476	1.620	0.880, 0.840	2.000 (CH ₃)
Met 2	8.070	4.400	1.810, 1.910	2.430, 2.38		
Val 3	7.650	4.183	1.954	0.820, 0.85		
Gly 4	8.280	3.800, 3.710				
Fmoc-A-I-I-G-OH						
Ala 1	7.550	4.106	1.190			
Ile 2	7.810	4.200	1.721	1.420, 1.05		
Ile 3	7.710	4.210	1.720	1.430, 1.05		
Gly 4	8.204	3.760, 3.680				
Fmoc-S(Bu')-N-K(Boc)-G-OH						
Ser 1	7.390	4.118	3.490, 3.427			1.358 (Bu')
Asn 2	8.140	4.547	2.560, 2.420			6.99, 7.43 (NH ₂)
Lys 3	7.920	4.167	1.360, 1.480	1.690	1.360, 1.305	2.850 (C ^ε) 1.112 (Boc)
Gly 4	8.220	3.730, 3.670				
Fmoc-A-E(OBu')-D(OBu')-V-G-OH						
Ala 1	7.535	4.080	1.200			1.348 (OBu')
Glu 2	8.000	4.291	1.850, 1.720	2.210		
Asp 3	8.280	4.610	2.690, 2.450			1.345 (OBu')
Val 4	7.590	4.180	1.970	0.840, 0.81		
Gly 5	8.260	3.770, 3.700				
Fmoc-D(OBu')-A-E(OBu')-F-R-OH						
Asp 1	7.680	4.366	2.640, 2.440			1.366 (OBu')
Ala 2	7.994	4.230	1.138			
Glu 3	7.675	4.195	1.648, 1.807	2.110		1.358 (OBu')
Phe 4	7.946	4.506	3.043, 2.790			
Arg 5	7.670	3.911	1.610	1.478	3.050	

* ¹H-ЯМР-спектр: DMSO-d₆, 500 МГц, 300 К, c ~ 3 мг/мл.

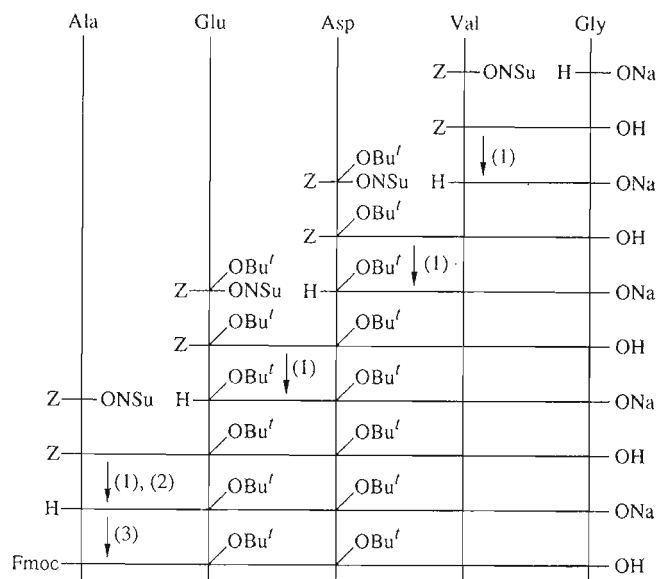


Рис. 5. Схема синтеза пептидного фрагмента F4: (1) – H_2 , 5% Pd/C; (2) – аналитическая и препаративная ВЭЖХ; (3) – Fmoc-ONSu в водных диоксане или ацетонитриле.

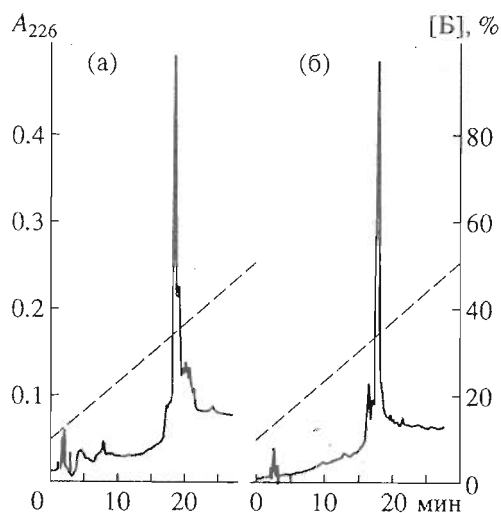


Рис. 6. Профили аналитической ВЭЖХ сырого продукта ступенчатого (а) и фрагментного (б) твердофазного синтеза пептида β A4 на колонке (4.6×250 мм) PRP-1. Элюция градиентом концентрации буфера Б в буфере А (от 10 до 50% за 30 мин); буфер А – 0.05 М Na_2HPO_4 , буфер Б – 70% ацетонитрила в буфере А; скорость потока 1.0 мл/мин. Содержание целевого продукта (%): 74.5 (а), 83.8 (б).

При проведении фрагментного синтеза в качестве исходного был использован пентапептидил-полимер Fmoc-Gly-Val-Val-Ile-Ala-(P) с нагрузкой 0.2 ммоль/г. Фрагменты конденсировали с помощью N,N -дизопропилкарбодиимида и HOBT в смеси DMF–NMP (1 : 1). N-Концевой пентапептид присоединяли этим же методом в присутствии 1 экв.

бромгидрата пиридина, необходимого для протонирования гуанидиновой группы аргинина [21]. Полноту присоединения фрагментов контролировали качественно тестом Кайзера [22], по результатам которого все пептидные блоки были присоединены с достаточно высокими выходами (>95%). Судя по данным ВЭЖХ (рис. 6а, 6б), фрагментный синтез позволил получить сырой продукт с более высоким содержанием целевого пептида.

Следует отметить, что аналитический контроль гомогенности и очистка фрагментов β -амилоида представляют достаточно сложную задачу из-за их плохой растворимости и склонности к агрегации. Поэтому, учитывая характеристику пептида (рI 5–6), мы пытались работать с ним как в кислых, так и в щелочных условиях, а также в водно-органических смесях. Сырой продукт твердофазного синтеза был нерастворим в водных (10–30%) растворах уксусной и муравьиной кислот, SDS, 8 М растворе мочевины и других традиционных для гель-хроматографии системах. Несмотря на то что пептид хорошо растворялся в концентрированных растворах (>70%) муравьиной, уксусной и трифторуксусной кислот, использовать эти растворители в качестве элюентов в традиционных видах хроматографии также не представлялось возможным, так как в указанных растворах этот пептид, по-видимому, довольно быстро агрегировал и его содержание в мономерном состоянии (судя по ВЭЖХ) быстро падало. При переходе к щелочным значениям pH картина существенно менялась. Так, сырой продукт растворялся в 0.1% водном аммиаке в относительно высокой концентрации (~10–15 мг/мл) и, что очень важно, эти растворы были достаточно устойчивы. При использовании 0.1% раствора аммиака в комбинации с ToyoPearl HW-40 нам не удалось добиться удовлетворительного разделения. Однако на сефадексе G-50 продукт твердофазного синтеза удалось разделить на две фракции (рис. 7). При этом пик II соответствовал целевому пептиду, содержание которого составляло 90–95%, по данным ВЭЖХ, в зависимости от условий синтеза (табл. 1). Фракция I помимо некоторого количества целевого продукта содержала примеси, в том числе, судя по данным масс-спектрометрии, *трет*-бутильное производное целевого пептида. Рехроматография вещества, соответствовавшего пику I, позволила выделить еще некоторое количество искомого продукта. Материальный баланс гель-хроматографического разделения показывает, что необратимой сорбции пептида β A4 на сефадексе G-50 не происходит.

В литературе неоднократно указывалось, что ВЭЖХ пептида β A4-(1–42) и родственных пептидов либо неудовлетворительны, неинформативны, либо вообще безуспешны [7, 23]. А если и есть указания на то, что синтетический пептид был подвергнут очистке методом ВЭЖХ, то отсутствуют

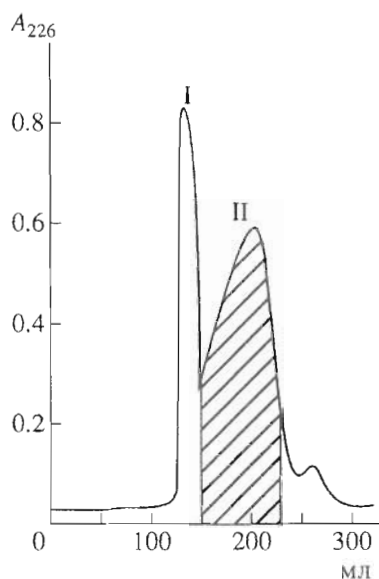


Рис. 7. Профиль элюции пептида β A4 при хроматографии на сефадексе G-50 (fine) в 0.1% водном аммиаке. Размер колонки 2.6 \times 80 см, скорость элюции 25 мл/ч. Заштрихована фракция, соответствующая целевому пептиду.

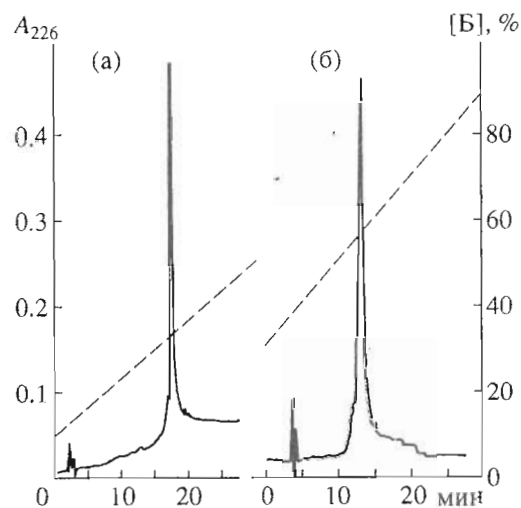


Рис. 8. Профили аналитической ВЭЖХ продукта после гель-хроматографии на сефадексе G-50 (а) на колонке PRP-1 в условиях, приведенных на рис. 6; (б) – на колонке (4.6 \times 250 мм) Lichrosorb RP2, элюция градиентом буфера Б в буфере А (от 30 до 90% за 30 мин), буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Содержание целевого продукта (%): 95.0 (а), 94.5 (б).

либо хроматограммы и условия разделения, либо названия сорбентов, на которых оно было проведено [3, 7].

Нами в качестве водной фазы (буфер А) были опробованы как кислые буферные растворы – 0.1% TFA, 0.05 M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 3.0), так и основные – 0.05 M K_2HPO_4 (pH 7.0, 7.5, 8.0) и 0.1% водный аммиак. Органическая фаза (буфер Б) представляла собой смесь из 70–80% ацетонитрила и 30–20% буфера А соответственно.

В наших экспериментах выбор сорбентов ограничивался Диасорбом C16, Vydac C18, Ultrasphere ODS, Lichrosorb RP2, PRP-1. Мы получили удовлетворительные результаты только в случае комбинации Lichrosorb RP2 с 0.1% трифторуксусной кислотой (рис. 8б) и в случае PRP-1 в щелочной среде как с 0.1% водным аммиаком, так и с двузамещенными фосфатами (см., например, рис. 8а). Эти сорбенты и условия можно рекомендовать для препаративной очистки пептида β A4-(1–42) и родственных пептидов при необходимости получения их с чистотой >95%. В настоящее время выпускаются сорбенты для ВЭЖХ, позволяющие работать при значениях pH > 7.0. Исходя из нашего опыта мы можем рекомендовать их для очистки и контроля пептида β A4-(1–42) и подобных пептидов, так как при ВЭЖХ таких пептидов в щелочных буферах удается получить хроматографическую картину с достаточно хорошо разрешенными пиками, соответствующими целевому продукту и примесям.

Таким образом, проведение твердофазного синтеза пептида β A4-(1–42) в смеси DMF–NMP (1 : 1) на полимере с низкой степенью замещения (0.2 ммоль/г) и последующая его очистка на сефадексе G-50 в 0.1% водном растворе аммиака позволили нам получить целевой пептид в препаративных количествах с высоким выходом (45–50% в расчете на стартовую аминокислоту) и чистотой 90–95%. Аналитический контроль гомогенности данного и родственных пептидов может быть осуществлен ВЭЖХ на сорбенте PRP-1 в градиенте концентрации ацетонитрила в щелочных буферных растворах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные L-аминокислот (Bachem, Швейцария); феюл и HOBT (Merck, Германия); BOP (Milligen Biosearch, США); EDT, DIC, DIEA, DBU (Fluka, Швейцария). Для синтеза применяли NMP-полимер (0.94 ммоль/г гидроксигрупп), N-метилпирролидон, дихлорметан, пиперидин, метанол, TFA и уксусный ангидрид (Applied Biosystems, Германия). DMF перегоняли над нингидрином и оксью бария. Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонках Lichrosorb RP2 (10 мкм; 4.6 \times 250 мм; Merck, Германия) и PRP-1 (5 мкм; 4.6 \times 250 мм; Hamilton, Англия) на хроматографе (Gilson, Франция) с использованием ацетонитрила (Technopharm, РФ), детекция осуществлялась при 226 нм. Для гель-фильтрации использовали сефадекс G-50 (fine) (Pharmacia, Швеция). Для аминокислотного анализа пептиды гидролизали 24,

Таблица 4. Аминокислотный анализ пептида β A4-(1-42)*

Остаток (количество)	Время гидролиза, ч		
	24	60	80
Asx (4)	4.07	3.92	3.52
Ser (2)	2.10	1.68	0.88
Glx (4)	4.03	4.18	3.59
Gly (6)	6.00	6.00	6.00
Ala (4)	4.20	4.41	3.95
Val (6)	3.30	4.20	6.01
Met (1)	1.20	1.03	1.36
Ile (3)	1.20	1.57	2.94
Leu (2)	1.95	1.93	1.86
Tyr (1)	1.13	0.87	1.14
Phe (3)	2.65	2.57	2.74
His (3)	2.80	3.00	3.64
Lys (2)	2.30	1.53	2.60
Arg (1)	1.03	0.94	0.86

* Гидролиз 6 н. соляной кислотой, содержащей 2% тиогликолевой кислоты, при 110°C.

60 и 80 ч при 110°C 6 н. HCl, содержащей 2% тиогликолевой кислоты. Аминокислотный состав гидролизатов определяли на автоматическом анализаторе Biotronik 5001 (Германия). Масс-спектры снимали на квадрупольном масс-спектрометре Finnigan MAT TSQ 700 (Германия) с электроспреемным (API) ионным источником (Finnigan MAT). Образцы пептидов для масс-спектрометрии растворяли в смеси муравьиной кислоты и метанола (1 : 1). ¹H-ЯМР-спектры снимали на спектрометре WM-Bruker 500 МГц (США) в DMSO-d₆ при 300 К, в качестве внутреннего стандарта применяли тетраметилсилан. В работе использовали азот (в баллонах) марки ос. ч. Пептиды синтезировали на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 431A (Германия).

Твердофазный синтез пептидов. Стартовую аминокислоту Fmoc-Ala-OH присоединяли к HMP-полимеру через соответствующий симметричный ангидрид в присутствии 0.1 экв. диметиламинопиридина в смеси DMF-DCM (1 : 1). Незамещенные гидроксильные группы блокировали в течение 30 мин действием 10-кратного избытка уксусного ангидрида в присутствии 10 экв. DIEA в DMF. Степень замещения в аминокислотном полимере определяли спектрофотометрически по содержанию аддукта дибензофульвена с пиперидином в фильтрате после отщепления Fmoc-защиты. Во всех опытах исходили из 0.5–0.8 г Fmoc-Ala-(P). Цикл ступенчатого твердофазного синтеза включал следующие стадии: промывка смесью DMF-NMP; 20-минутное деблокирование α -аминогрупп 20% раствором пи-

перидина в смеси DMF-NMP (А) или раствором 2% DBU и 2% пиперидина в DMF-NMP (Б) в процессе синтеза последовательности 29–42, далее – реагентом А; конденсация с использованием 5 экв. Fmoc-аминокислоты, 5 экв. HOBT, 5 экв. BOP и 10 экв. DIEA в 5 мл смеси DMF-NMP дважды в течение 50 мин; промывка смесью DMF-NMP. При проведении фрагментного синтеза промывки и деблокирование пептидилполимеров осуществляли так же, как в ступенчатом варианте. Пептидные фрагменты (5 экв.) растворяли в минимальном объеме смеси DMF-NMP (1 : 1), прибавляли 5 экв. HOBT и 5 экв. DIC, охлаждали до 4°C и через 30–40 мин объединяли с соответствующим аминокислотным компонентом. Через 2 ч конденсацию повторяли в тех же условиях. Полноту ацилирования контролировали качественно тестом Кайзера.

Деблокирование и очистка пептида β A4-(1-42). По окончании синтеза пептид отщепляли от носителя смесью 8.25 мл TFA, 0.5 г фенола, 0.5 мл деионизованной воды, 0.5 мл тиоанизола и 0.25 мл EDT в течение 5–24 ч при 20°C в зависимости от применявшегося производного аргинина, контролируя полноту отщепления защитной группы с помощью ВЭЖХ. Полимер отфильтровывали, промывали деблокирующей смесью (3 × 2 мл), фильтрат упаривали до объема ~3 мл и прибавляли сухой этилацетат. Осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, смесью этилацетат-изопропиловый спирт (1 : 1), сухим эфиром и сушили. Полученное вещество порциями по 100–150 мг хроматографировали на колонке (2.6 × 80 см) с сефадексом G-50 (fine), уравновешенной 0.1% водным раствором аммиака. Пептиды элюировали со скоростью 25 мл/ч, детекцию проводили при 226 нм. Фракции, соответствовавшие пикам I и II (см. рис. 6), объединяли и лиофилизировали. Вещество, соответствовавшее пику I, рехроматографировали в тех же условиях с половинными нагрузками на колонку. Выходы и аналитические характеристики полученных веществ приведены в табл. 1 и 4 и на рис. 4 и 8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kirschner D.A., Inouye H., Duffy L.K., Sinclair A., Lind M., Selkoe D.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 6953–6957.
2. Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Malhaup G., Beyreuther K., Muller-Hill B. // Nature. 1987. V. 325. P. 733–736.
3. Barrow C.J., Yasuda A., Kenny P.T.M., Zagorski M.G. // J. Mol. Biol. 1992. V. 225. P. 1075–1093.
4. Halverson K.J., Fraser P.E., Kirschner D.A., Lansbury P.T., Jr. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 2639–2644.
5. Yanker B.A., Duffy L.K., Kirschner D.A. // Science. 1990. V. 250. P. 279–282.
6. Hendrix J.C., Halverson K.J., Lansbury P.T., Jr. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 7930–7931.

7. Snyder S.W., Lador U.S., Wade W.S., Wang G.T., Barrett L.W., Matayoshi E.D., Huffaker H.J., Krafft G.A., Holzman T.F. // *Biophys. J.* 1994. V. 67. P. 1216-1228.
8. Hendrix J.C., Halverson K.J., Jarrett J.T., Lansbury P.T., Jr. // *J. Org. Chem.* 1990. V. 55. P. 4517-4518.
9. Kent S.B.H. // *The Peptides, Structure and Function. Proc. 9th Am. Pept. Symp. / Eds C. Deber, V. Hruby, K. Koppl. Rocford (Il.): Pierce Chem. Company, 1985. P. 407-414.*
10. Barrow C.J., Zagorski M.G. // *Science.* 1991. V. 253. P. 179-182.
11. Krchnak V., Fleggerova Z., Vagner J. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1993. V. 42. P. 450-454.
12. Fields G.B., Fields C.G. // *The Peptides. Proc. 12th Am. Pept. Symp. / Eds E. Giralt, D. Andreu. Leiden: ESCOM, 1991. P. 120.*
13. Zhang L., Goldammer C., Henkel B., Zuhl F., Panhaus G., Jung G., Bayer E. // *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Peptides, Proteins and Nucleic Acids / Ed. R. Epton. Birmingham: Mayflower Worldwide Ltd., 1994. P. 711.*
14. Packman L.C., Quibell M., Johnson T. // *Peptide Res.* 1994. V. 7. P. 125-131.
15. Hendrix J.C., Lansbury P.T., Jr. // *J. Org. Chem.* 1992. V. 57. P. 3421-3426.
16. Wade J.D., Bedford J., Sheppard R.C., Tregear G.W. // *Peptide Res.* 1991. V. 4. P. 194-199.
17. Beyermann M., Bienert M. // *Tetrahedron.* 1992. V. 33. P. 3745-3748.
18. King D.S., Fields C.G., Fields G.B. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990. V. 36. P. 255-266.
19. Bodansky M., Martinez J. // *The Peptides. V. 5 / Eds E. Gross, J. Meienhofer. N.Y.: Acad. Press Inc., 1983. P. 111-216.*
20. Benz H. // *Synthesis.* 1994. P. 337-358.
21. Сидорова М.В., Кудрявцева Е.В., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. С. 675-683.
22. Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I. // *Anal. Biochem.* 1970. V. 34. P. 595-598.
23. Sweeney P.J., Darker J.G., Neville W.A., Humphries J., Camilleri P. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 212. P. 179-184.

Solid Phase Synthesis of β -Amyloid(1-42)

M. V. Sidorova, A. S. Molokoedov, M. V. Ovchinnikov,
Zh. D. Bespalova, and V. N. Bushuev

*Cardiological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences,
Tret'ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia*

Abstract—A solid phase synthesis of the polypeptide corresponding to the 1-42 sequence of β -amyloid protein that accumulated in brain cells during Alzheimer's disease was performed using Fmoc strategy. Two alternative approaches to the synthesis, stepwise elongation of the peptide chain and fragment coupling, were compared, and the advantage of the latter approach was shown. Effects of various factors (solvents, reagents for deprotection of α -amino functions, and substitution level of polymer carrier) on the synthesis was studied. The appropriate conditions of HPLC for an analysis of the homogeneity of the β A4(1-42) peptide, as well as the conditions of its gel chromatography on Sephadex G-50 providing the preparation of the end product of 90-95% purity according to HPLC were found.

Key words: β -amyloid(1-42), Alzheimer's disease, difficult sequence, solid phase peptide synthesis, fragment coupling, HPLC.