



УДК 541.49:542.422:547.963.4

СИНТЕЗ АРГИНИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ И ИХ КОНЪЮГАТОВ С ПРОТОГЕМИНОМ IX И ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНОМ

© 1999 г. Р. П. Евстигнеева, Г. А. Желтухина[#], В. Халиль, Е. И. Ефимова

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 18.01.99 г. Принята к печати 19.04.99 г.

Осуществлен синтез аргининсодержащих пептидов и их конъюгатов с протогеминном IX на твердой фазе с использованием полимера Меррифилда. Получены конъюгаты аргининсодержащих пептидов с тетрафенилпорфирином с использованием в качестве активирующего агента трихлорида фосфора.

Ключевые слова: пептиды, аргининсодержащие; гемин; порфирин; геминпептид; полимер-носитель; твердофазный синтез.

Пептидные производные порфиринов и их металл комплексов представляют интерес вследствие многообразия их биологических и физико-химических свойств. Ранее в нашей лаборатории были получены гистидинсодержащие геминпептиды, моделирующие активные центры гемоглобина и пероксидаз [1, 2]; отработаны методы синтеза монопептидных производных по пропионильной группе протогемина IX как в растворе, так и на твердой фазе [3, 4], и исследован ряд их свойств.

Цель настоящей работы – синтез аргининсодержащих пептидов и их конъюгатов с геминном и тетрафенилпорфирином для дальнейшего изучения физико-химических свойств этих модельных соединений, а также влияния на указанные свойства природы отдельных аминокислот, входящих в их состав. Мы предприняли синтез геминпептидов, содержащих один и более остатков аргинина. Эта аминокислота играет важную роль в функционировании целого ряда белков [5, 6].

Сложность синтеза аргининсодержащих геминпептидов связана с отсутствием подходящих защитных групп для гуанидиновой функции аргинина, не требующих для удаления жестких условий или гидрирования, что недопустимо при наличии остатка гемина в молекуле, и с проблемой введения ω-незащищенного остатка Arg в пептидную цепь. Кроме того, при получении геминпептидов трудность представляет присоединение пептидного фрагмента только по одному из остатков про-

пионовой кислоты порфирина. Учитывая это, при построении пептидной цепи мы использовали аргинин, протонированный по гуанидиновой группе, а синтез монопептидных производных по остатку пропионовой кислоты протогемина IX осуществляли модифицированным карбодиимидным методом, который был описан ранее [4] и заключается в медленном прибавлении раствора дициклогексилкарбодиимида к разбавленному раствору протогемина IX в присутствии *N*-оксисукцинимид.

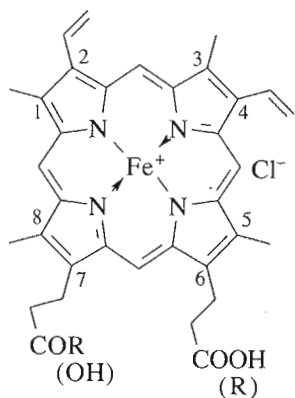
Синтез соединений (I), (II) был проведен твердофазным методом на доступном носителе – хлорметилированном сополимере стирола с 2% дивинилбензола; ранее в лаборатории для подобных целей использовали опытный образец полиамидного полимера “TRILAR” со щелочелабильной якорной группой [1, 3].

Аминокислотная последовательность пептидного фрагмента соединения (I) -Gly-Pro-Arg- соответствует участку 17–19 α-цепи фибриногена человека [7]. Другая выбранная нами пептидная последовательность представляет собой производное брадикинина, содержащего два остатка аргинина и, как и в предыдущем случае, диглициновый фрагмент на C-конце, – дез-Pro⁷-брадикинил-глицил-глицин.

Синтез пентапептида и производного брадикинина на твердой фазе проводили с C-конца с использованием Вос-производных аминокислот (схемы 1 и 2). Присоединение стартовых Вос-аминокислот к хлорметилированному носителю осуществляли методом цезиевых солей [8], замещение остаточного галогенида – обработкой аминоацилполимеров 5-кратными избытками ацетата цезия [9], блокирование возможно образовавшихся гидроксиметильных групп – обработкой 10-кратными избытками уксусного ангидрида и триэтиламина

Сокращения: TFA – трифторуксусная кислота; NH₂-TPP – 5-(*n*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирин; HOBT – 1-гидроксибензотриазол; OPfp – пентафторфенилокси; ONSu – *N*-оксисукцинимидил; DMAP – 4-*N,N'*-диметиламинопиридин; Py – пиридин.

[#] Автор для переписки.

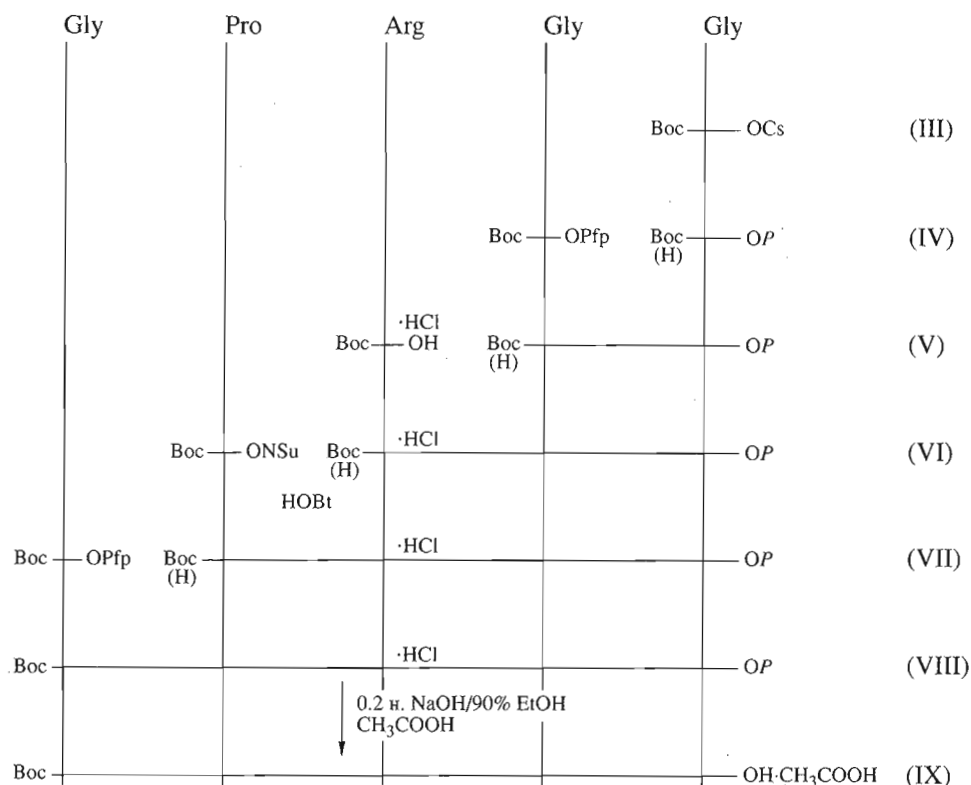


R: -Gly-Pro-Arg-Gly-Gly-OMe (I)
 -Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Phe-Arg-Gly-Gly-OMe (II)

[10]. Полученные пептидполимеры деблокировали двукратной обработкой 50% трифторуксусной кислотой в хлористом метиле в течение 15 мин с последующей нейтрализацией действием 10% триэтиламина в DMF в течение 15 мин. Для создания пептидной связи на полимере применяли трехкратные избытки активированных пентафторфениловых и *N*-оксисукцинимидных эфиров Вос-аминокислот. Полноту протекания реакций пептидообразования контролировали с помощью нингидринового теста [11]. Следует отметить, что ввиду высокого содержания пептидов в пептидил-

полимерах (0.7 ммоль/г для пентапептидполимера (VIII) и 1.06 ммоль/г для дез-Pro⁷-брадикинил-глицил-глицил-полимера (XIX)) ряд стадий в синтезах того и другого продукта потребовал большего времени и избытков ацилирующих агентов.

Для доказательства структуры полученных пептидов они были отщеплены от проб соответствующих пептидполимеров. Целевой пентапептид (IX) был отщеплен от пептидполимера (VIII) омылением 0.2 н. NaOH в водно-спиртовой среде (90% этанол) [10] и после нейтрализации уксусной кислотой очищен колоночной хромато-



P — полимер (здесь и на других схемах)

Схема 1. Твердофазный синтез пентапептида Вос-Gly-Pro-Arg-Gly-Gly-OH · CH₃COOH.

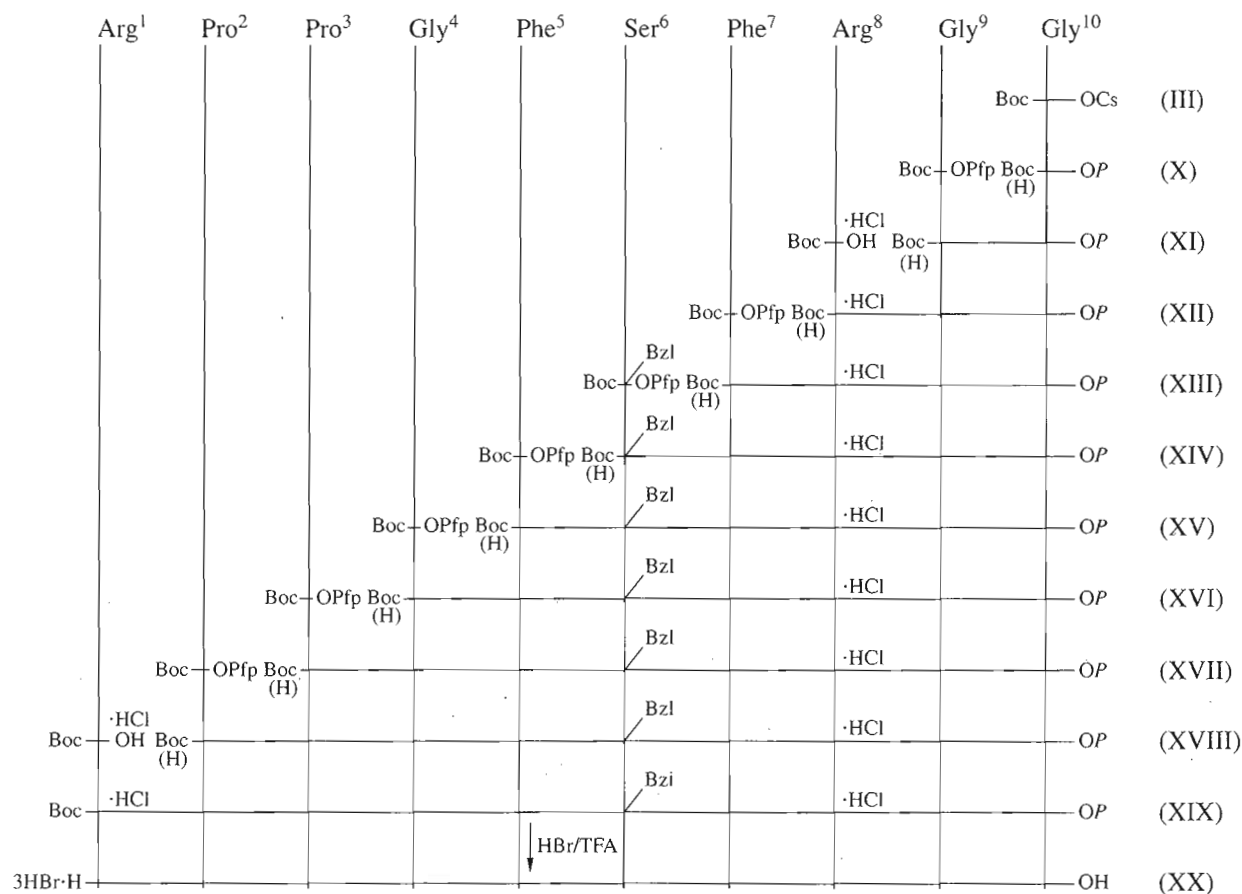


Схема 2. Твердофазный синтез тригидробромида (дез-Pro⁷-брадикинил)-глицил-глицина.

графией на силикагеле и охарактеризован. Выход его был достаточно высок и составил 36% в расчете на содержание стартового Gly в аминокислотном полимере (IV).

Отщепление дез-Pro⁷-брадикинил-глицил-глицина от небольшой порции пептидполимера (XIX) проводили действием сухого бромистого водорода в трифторуксусной кислоте [10]. Целевой пептид (XX) был очищен колоночной хроматографией на носителе "Фторосорб", представляющем собой макропористое тефлонизированное стекло с радиационно привитым полистиролом [12], и получен с выходом 40%. Общий выход пептида (XX) составил 14% в расчете на содержание стартовой аминокислоты в полимере. Как и пентапептид (IX), соединение (XX) было охарактеризовано ТСХ и ВЭЖХ, определением удельного угла оптического вращения, а также количественным аминокислотным анализом.

Геминные производные пептидов получали на твердой фазе, ацилируя деблокированные пептидполимеры (VIII) и (XIX) 3-кратным избытком 6(7)-моно-*N*-оксисукцинимидного эфира протогемина IX (XXI) (схема 3). Соединения (I) и (II) были отщеплены от соответствующих геминпеп-

тидполимеров (XXII) и (XXIII) переэтерификацией в 20% растворе триэтиламина в метаноле и очищены колоночной хроматографией на силикагеле. Для замены противоиона OMe⁻ на Cl⁻ при атоме железа гемина отщепленные геминпептиды обрабатывали последовательно водными растворами 0.5 н. HCl, 2% Na₂CO₃, насыщенным NaCl [3]. Выходы пептидных производных гемина (I) и (II) составили соответственно 16 и 13.3% в расчете на содержание геминпептидов в полимерах (XXII) и (XXIII). Геминпептиды охарактеризованы ТСХ, электронными и масс-спектрами, аминокислотным и элементным анализами.

Родственным геминпептидам классом соединений являются пептидные производные безметалльных порфиринов [13]. Последние могут представлять интерес в качестве соединений сравнения для соответствующих металлокомплексов, а также соединений, содержащих хромофор по C-концу пептида. В связи с этим, нами был предпринят синтез пептидных производных 5-(*n*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфина с использованием синтетических аргининсодержащих три- и пентапептидов, а также одного остатка аргинина.

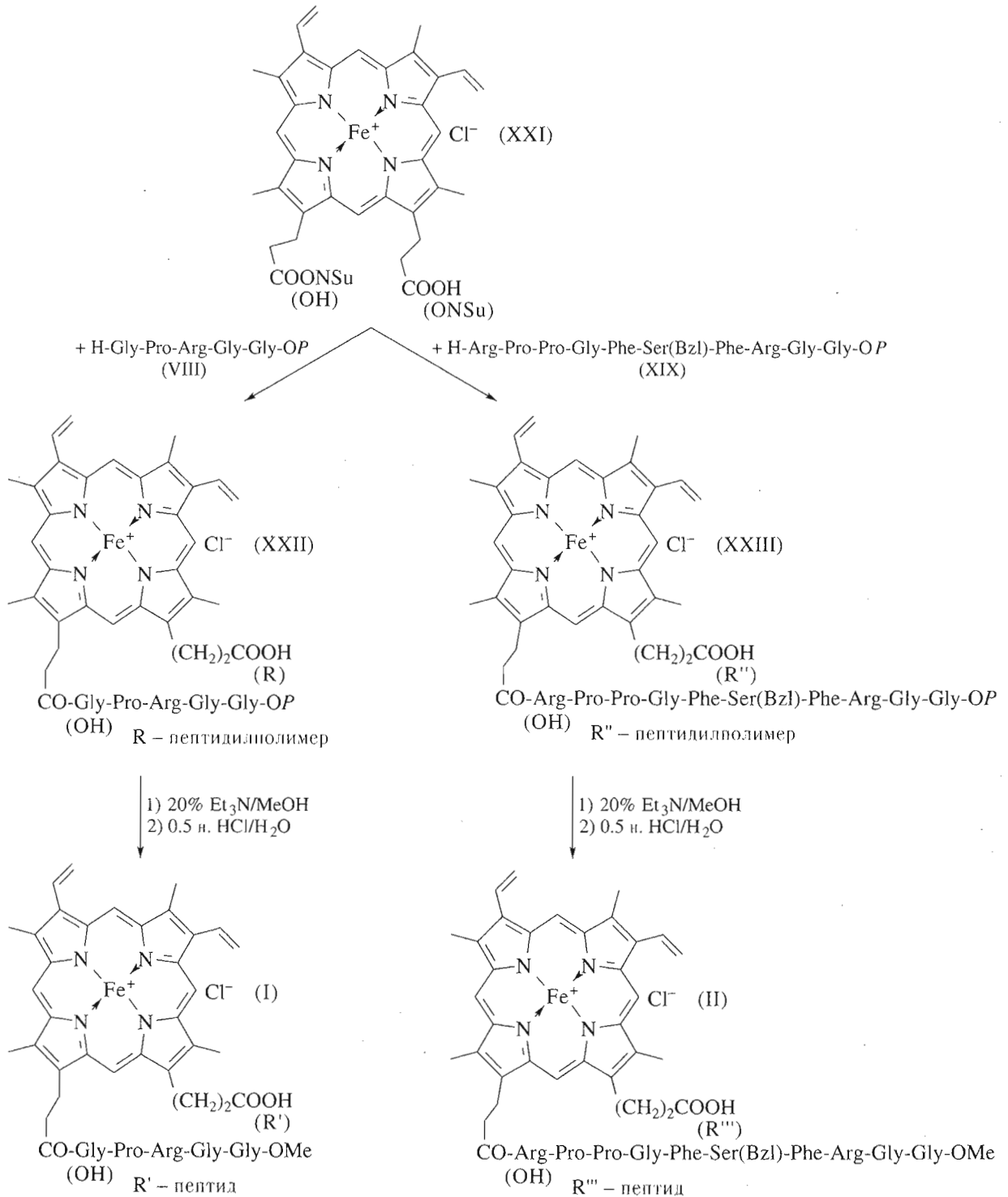


Схема 3. Синтез аргининсодержащих геминпептидов.

Создание связи между С-концевой карбоксильной группой пептидного фрагмента и аминогруппой 5-(*n*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирина (XXV), и в особенности, если С-концевой аминокислотой является Arg, представляет собой отдельную задачу. Для ее решения известны раз-

личные методы: изоцианатный, карбодимидный, фосфоразный, фосфорноангидридный [14], а также метод смешанных ангидридов с использованием производных угольной кислоты [15, 16]. Учитывая литературные данные [17, 18] о том, что при использовании PCl₃ для создания амидной

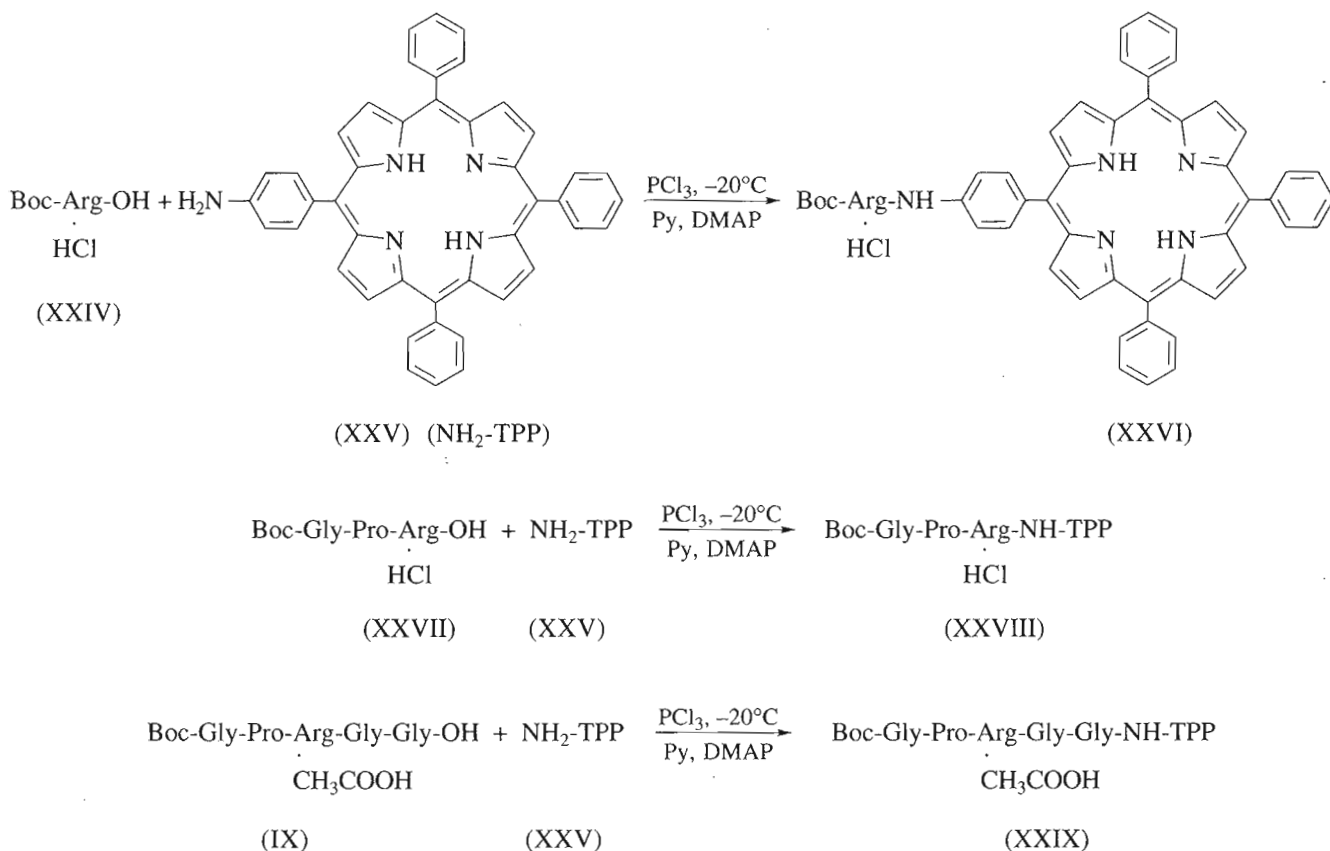


Схема 4. Синтез пептидных производных 5-(*n*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирина.

связи между карбоксильной группой остатка аргинина и *n*-нитроанилином достигаются удовлетворительные выходы продуктов (до 37%), мы применили этот реагент для присоединения Boc-Arg-OH · HCl по NH₂-группе к 5-(*n*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфиру. Реакция проводилась нами в присутствии каталитических количеств DMAP и при низкой температуре. Выход целевого соединения Boc-Arg-NH-TPP (XXVI) составил 56%, что заметно выше, чем значения, приведенные в литературе [17, 18] для выхода продуктов подобных реакций производных аминокислот с аминокислотами, содержащими, как и в нашем случае, аминогруппу с пониженной реакционной способностью в составе ароматической системы (29–37%).

При проведении реакции с использованием указанного метода с более объемным карбоксильным компонентом, а именно с трипептидом (XXVII), содержащим на C-конце остаток аргинина, протонированный по гуанидиновой группе, выход трипептидил-NH-TPP (XXVIII), как и следовало ожидать, был ниже – 26% (схема 4). Трипептид Boc-Gly-Pro-Arg-OH · HCl (XXVII) был получен по описанной ранее методике [19]. Вследствие того, что амидная связь создавалась между

остатком аргинина, входящего в состав пептида, и NH₂-TPP, и способ ее создания с применением трихлорида фосфора несколько отличался от описанной в литературе и гарантирующей оптическую чистоту методики [18], полностью нельзя исключить возможность рацемизации. Нами доказательство сохранения оптической чистоты остатка аргинина не проводилось, так как оно сопряжено с известными трудностями и не является принципиальным для дальнейших исследований физико-химических свойств соединения (XXVIII).

Так как попытки присоединения Boc-Arg-OH · HCl к хлорметилированному полимеру Меррифила не привели к достижению удовлетворительного содержания аминокислоты в полимере, то твердофазный синтез аргининсодержащего пептида (IX) осуществляли исходя из диглицилполимера (схема 1). Реакция отщепленного от полимера пентапептида Boc-Gly-Pro-Arg-Gly-GlyOH · CH₃COOH (IX) с производным порфирина (XXV) осуществлялась нами в тех же условиях с использованием трихлорида фосфора. Выход пентапептидил-NH-TPP (XXIX), как и следовало ожидать, был выше, чем выход трипептидил-NH-TPP (XXVIII), и составил 54%, что обусловлено наличием подвижного диглицинового фрагмента на C-конце пептида.

Таким образом, в результате работы были получены аргининсодержащие пептидные производные гемина с применением твердофазного метода синтеза. Кроме того, осуществлен синтез аргининсодержащих пептидных производных 5-(*n*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирина (XXV) с использованием в качестве активирующего агента для создания амидной связи между пептидом и порфирином трихлорида фосфора. Введение остатков глицина по С-концу пептида привело к повышению выхода реакции пептида, содержащего незащищенный по гуанидиновой функции остаток аргинина, с порфирином.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезе использовали производные *L*-аминокислот (Reanal, Венгрия). Индивидуальность полученных соединений подтверждали с помощью ТСХ на пластинках "Silufol UV 254" (Чехия) в системах растворителей: *n*-бутанол–уксусная кислота–вода, 4 : 1 : 5, верхняя фаза (А); *n*-бутанол–уксусная кислота–пиридин–вода, 10 : 2 : 10 : 8 (Б); хлороформ–метанол, 8 : 2 (В). Пептиды на хроматограммах обнаруживали с помощью раствора нингидрина и хлор-толидинового реагента [20], а также реактива Сакагучи [21]. ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Gilson-305 (США). Гидролиз пептидилполимеров, пептидов и их производных проводили в смеси 12 н. соляной и ледяной уксусной кислот (1 : 1) при 140°C в течение 2 ч. Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе Biotronik-7025 (Германия). Величины углов удельного оптического вращения измеряли на спектрополяриметре Perkin-Elmer-241 (Швеция). Температуры плавления веществ определяли на термоплавильном столике Voetius (Германия). Электронные и ИК-спектры регистрировали, соответственно, на приборах Shimadzu UV-254 (Япония) и Shimadzu IR-435 (Япония). Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на времяпролетном плазменно-десорбционном масс-спектрометре МСБХ (Украина) (ионизация с помощью ядер ²⁵²Cf).

В качестве полимерной матрицы в синтезе пептидов и геминпептидов использовали хлорметилированный сополимер стирола и 2% дивинилбензола (смола Меррифилда) с содержанием хлора 7.1–9.2% (Reanal, Венгрия). Твердофазный синтез пептидов осуществляли в соответствии с Вос-стратегией [10]. Нагрузку стартовой аминокислоты на носителе определяли спектрофотометрически с применением пикриновой кислоты [22] и по данным количественного аминокислотного анализа. Для замещения непрореагировавшего хлора на полимере использовали ацетат цезия [9]. Деблокирование Вос-пептидилполимеров осуществляли по следующей схеме: 1) промывка хлористым метиленом 2 мин × 2; 2) обработка 50% раствором

ТФА в хлористом метилене 15 мин × 2; 3) промывка хлористым метиленом 2 мин × 2; 4) промывка DMF 2 мин × 2; 5) нейтрализация 10% раствором Et₃N в DMF 10 мин × 2; 6) промывка DMF 2 мин × 2. Полноту протекания реакций конденсации на полимере проверяли с помощью полуколичественного нингидринового теста [11].

N^α-[6(7)-(Протогемин IX)-ил]-Gly-Pro-Arg-Gly-Gly-OMe (I). К 2.1 г полимера (*P*-Cl 4.73 ммоль Cl), суспендированного в 5 мл DMF, добавляли раствор 2.04 г (6.29 ммоль) Вос-Gly-OCs в 8 мл DMF, перемешивали 48 ч при 40°C и оставляли без перемешивания на 24 ч при 20°C [8]. Аминоацилполимер (IV) отфильтровывали, промывали DMF (2 мин × 2), смесью DMF–вода, 1 : 1 (2 мин × 2), DMF (2 мин × 2), хлороформом (2 мин × 2), метанолом (2 мин × 1), хлороформом (2 мин × 1). Объем одной порции промывочного раствора 5 мл. Содержание глицина в аминоацилполимере (IV) 0.7 ммоль/г. Для блокирования остаточного хлора на полимере (3.33 ммоль) к аминоацилполимеру (IV) прибавляли раствор 0.7 г (3.75 ммоль) ацетата цезия в 8 мл DMF, перемешивали 2 ч при 40°C и оставляли без перемешивания на 20 ч при 20°C. Аминоацилполимер отфильтровывали, промывали как указано выше. Блокирование потенциально образовавшихся гидроксиметильных групп в аминоацилполимере проводили раствором 3.5 мл (37.5 ммоль) уксусного ангидрида и 5.2 мл (37.5 ммоль) Et₃N в 3 мл DMF в течение 1 ч [10]. Аминоацилполимер отфильтровывали, промывали DMF (2 мин × 2), хлороформом (2 мин × 2), метанолом (2 мин × 1), хлороформом (2 мин × 2), затем деблокировали, как описано выше. К деблокированному глицилполимеру (IV) (1.47 ммоль Gly) прибавляли раствор 1.28 г (3.75 ммоль) Вос-Gly-OPfr в 5 мл DMF, оставляли на 24 ч при 20°C, отфильтровывали, промывали DMF (2 мин × 2), хлороформом (2 мин × 2), метанолом (2 мин × 1), хлороформом (2 мин × 2). Нингидриновый тест пробы дипептидилполимера (V) отрицательный. К деблокированному дипептидилполимеру (V) прибавляли раствор 1.41 г (4.29 ммоль) активированного Вос-Arg-OH · HCl в 5 мл DMF и оставляли на 24 ч при 20°C. Пептидилполимер отфильтровывали, промывали аналогично описанному для дипептидилполимера (V). Нингидриновый тест положительный. Реакцию пептидообразования повторяли с использованием раствора 0.94 г (2.86 ммоль) Вос-Arg-OH · HCl в 5 мл DMF. Нингидриновый тест положительный (содержание непрореагировавших аминокрупп около 5%). Для блокирования непрореагировавших аминокрупп пептидилполимер (VI) выдерживали в течение 1 ч в растворе 0.067 г (0.37 ммоль) *n*-нитрофенилацетата и 0.05 г (0.37 ммоль) 1-гидроксibenзотриазола в 5 мл DMF [23]. Пептидилполимер отфильтровывали, промывали аналогично описанному для дипептидилполимера (V). К деблокированному трипептидилполи-

меру (VI) прибавляли раствор 1.32 г (4.22 ммоль) Вос-Pro-ONSu и 0.591 г (4.37 ммоль) 1-гидроксибензотриазола в 5 мл DMF. Оставляли на 24 ч при 20°C, отфильтровывали, промывали аналогично описанному для пептидилполимеров (V, VI). Нингидриновый тест положительный. Реакцию повторяли с использованием раствора 0.44 г (1.4 ммоль) Вос-Pro-ONSu и 0.193 г (1.4 ммоль) HOBT в 5 мл DMF. Нингидриновый тест отрицательный. К деблокированному пептидилполимеру (VII) добавляли раствор 1.54 г (4.5 ммоль) Вос-Gly-OPfr в 5 мл DMF и оставляли на 24 ч при 20°C. Пептидилполимер (VIII) отфильтровывали, промывали аналогично пептидилполимерам (V, VI, VII). Нингидриновый тест отрицательный. Получили 3.5 г пентапептидилполимера Вос-Gly-Pro-Arg-Gly-GlyOP (VIII).

Раствор 1.57 г (2.098 ммоль) 6(7)-моно-*N*-оксисукцинимидного эфира протогемина IX [4] в 10 мл DMF прибавляли к 1.5 г деблокированного пентапептидилполимера (VIII), выдерживали 24 ч при 20°C. Геминпептидилполимер (XXII) отфильтровывали, промывали. Содержание остаточных аминокрупп, определенное с помощью пикринового теста [22], составило 0.3 ммоль/г. К 2.0 г полученного геминпептидилполимера прибавляли 10 мл 20% раствора Et₃N в метаноле, перемешивали в течение 6 ч, оставляли на 18 ч. Смолу отфильтровывали, промывали 20% раствором Et₃N в метаноле (5 мл × 4). Из объединенного фильтрата растворители удаляли в вакууме. Остаток очищали хроматографически на колонке (1.4 × 40 см) с силикагелем 100/160, элюируя смесью хлороформ-метанол, 2 : 8. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, растворители удаляли в вакууме. Остаток промывали 0.5 н. водной HCl, 2% раствором Na₂CO₃, насыщенным раствором NaCl, водой, сушили в вакууме. Выход геминпептида (I) 0.095 г (16%), R_f 0.35 (A), 0.78 (B). Электронный спектр (хлороформ-метанол, 2 : 8), λ_{max}, нм (lgε): 397.5 (89.64), 490 (7.82), 598 (4.63). ИК-спектр (вазелиновое масло), ν, см⁻¹: 3341 (-NH), 1657 (амид I), 1561 (амид II). Найдено, %: C 54.32, H 5.72, N 14.67. C₅₂H₆₂N₁₂O₉FeCl · HCl · H₂O. Вычислено, %: C 54.55, H 5.72, N 14.68. Масс-спектр, m/z: [M - H]⁺ 1055. Аминокислотный анализ: Gly 3.0 (3), Pro 1.10 (1), Arg 1.20 (1).

3HBr · H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Gly-Gly-OH (XX). К 1.5 г хлорметилованного полимера Меррифилда (3.38 ммоль Cl) прибавляли раствор 1.8 г (6.1 ммоль) Вос-Gly-OCs в 6 мл DMF [8]. Перемешивали в течение 20 ч при 40°C и оставляли на 60 ч при 20°C. Аминоацилполимер (X) отфильтровывали, промывали аналогично описанному для аминоацилполимеров (V, VI, VII) (объем одной порции промывочного раствора 5 мл), сушили. Содержание глицина в аминоацилполимере составило 1.06 ммоль/г. Замеще-

ние остаточного хлора проводили исходя из 1.7 г (8.9 ммоль) ацетата цезия. Условия промывки аминоацилполимера (X) и последующей реакции ацетилирования аналогичны описанным для аминоацилполимера (IV). Твердофазный синтез пептидилполимера (XIX) осуществляли аналогично описанному выше синтезу пептидилполимера (VIII). Реакции образования пептидной связи на полимере проводили с использованием трехкратных избытков (по отношению к содержанию стартовой аминокислоты глицина в полимере) пентафторфениловых эфиров Вос-производных аминокислот (по 3.18 ммоль) в среде DMF в течение 24 ч. Получили 2.56 г пептидилполимера (XIX).

К 0.7 г пептидилполимера (XIX), суспендированного в 6 мл TFA, прибавляли 2 мл анизол и пропускали сухой бромистый водород в течение 1 ч. Смолу отделяли, промывали TFA (3 мл × 2), растворитель из фильтрата удаляли в вакууме, остаток растирали с абсолютным эфиром. Осадок отделяли, сушили в вакууме. Получили 0.33 г отщепленного продукта. Сырой продукт в количестве 20 мг очищали колоночной хроматографией (1 × 20 см) на носителе "Фторосорб" [12], элюируя 0.05% водным раствором TFA с градиентом метанола от 0 до 60%. Выход 8.0 мг (14% в расчете на исходное содержание Gly в полимере), R_f 0.23 (A), [α]_D²⁰ -50.0° (с 0.26, вода). Аминокислотный анализ: Pro 1.75 (2), Gly 2.93 (3), Phe 2.0 (2), Arg 1.92 (2), Ser не определяли. ВЭЖХ в условиях: колонка Separon C18 (3 × 250 мм), элюция 0.1% TFA в 45% водном ацетонитриле со скоростью 0.2 мл/мин, детекция рефрактометрическая – индивидуальный пик, время удерживания 6 мин.

N^α-[6(7)-(Протогемин IX)-ил]-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Phe-Arg-Gly-Gly-OMe (II). Деблокировали 0.92 г пептидилполимера (XIX) и прибавляли к нему раствор 1.586 г (2.1 ммоль) 6(7)-моно-*N*-оксисукцинимидного эфира протогемина IX (XXI) [4] в 10 мл DMF и оставляли на 48 ч. Далее обрабатывали как описано выше для соединения (I). Отщепленный продукт очищали хроматографией на колонке (2.5 × 30 см) с силикагелем 40/100, элюируя смесью метанол-уксусная кислота-вода, 8 : 1 : 1. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли, растворители удаляли в вакууме. Остаток промывали 0.5 н. водным раствором HCl, 2% раствором Na₂CO₃, насыщенным раствором NaCl, водой, остаток сушили в вакууме. Выход 0.08 г (13.3%), R_f 0.26 (A). Электронный спектр (метанол), λ_{max}, нм (lgε): 399.5 (73.32), 593.3 (7.38). ИК-спектр (вазелиновое масло), ν, см⁻¹: 3350 (-NH), 1660 (амид I), 1550 (амид II). Найдено, %: C 53.33, H 6.46, N 13.68. C₉₁H₁₁₂O₁₅N₂₀FeCl · 2HCl · 10H₂O. Вычислено, %: C 53.44, H 6.51, N 13.70. Аминокислотный анализ:

Gly 3.46 (3), Phe 2.44 (2), Pro 2.0 (2), Arg 2.044 (2), Ser не определяли.

N^α-Boc-Arg-NH-TPP · HCl (XXVI). Раствор 9.4 мг (0.03 ммоль) Boc-Arg-OH · HCl, 19.0 мг (0.03 ммоль) 5-(*n*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирина и 0.28 мг (2.32 мкмоль) ДМАР в 0.5 мл пиридина охлаждали до -18°C и добавляли к нему 2.4 мкл (0.028 ммоль) трихлорида фосфора. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -15°C и в течение 16 ч без охлаждения. Продукт осаждали добавлением гексана, отделяли, очищали хроматографически на колонке (1.75 × 18 см) с силикагелем 40/100, элюируя целевое вещество смесью хлороформ-метанол, 9 : 1. Выход 16.0 мг (56%), *R_f* 0.36 (В). Электронный спектр (хлороформ), λ_{max}, нм (lgε): 419.7 (5.46), 515.5 (4.11), 551.3 (3.78), 590 (3.61), 646.1 (3.48). ИК-спектр (вазелиновое масло), ν, см⁻¹: 3173 (-NH), 1700 (C=O, уретан), 1666 (амид I), 1597 (амид II). Масс-спектр, *m/z*: [M + H]⁺ 886. Аминокислотный анализ: Arg 1.0 (1).

N^α-Boc-Gly-Pro-Arg-NH-TPP · HCl (XXVIII). Получали аналогично соединению (XXVI) из 36 мг (78 мкмоль) трипептида Boc-Gly-Pro-Arg-OH · HCl (XXVII), 49.0 мг (78 мкмоль) производного порфирина (XXV) в присутствии 1.3 мг (10.7 мкмоль) ДМАР и 5.2 мкл (0.06 ммоль) трихлорида фосфора. Продукт очищали хроматографически на колонке (1.75 × 20 см) с силикагелем 40/100, элюируя целевое вещество смесью хлороформ-метанол, 7 : 3. Выход 20.0 мг (26%), *R_f* 0.48 (В). Электронный спектр (хлороформ), λ_{max}, нм (lgε): 419.5 (5.67), 515.5 (4.13), 551.3 (3.84), 582.7 (3.67), 645.9 (3.60). ИК-спектр (вазелиновое масло), ν, см⁻¹: 3264 (-NH), 1721 (C=O, уретан), 1660 (амид I), 1561 (амид II). Масс-спектр, *m/z*: [M + 2H]⁺ 1042.5. Аминокислотный анализ: Gly 1.0 (1), Pro 1.1 (1), Arg 0.98 (1).

N^α-Boc-Gly-Pro-Arg-Gly-Gly-NH-TPP · CH₃COOH (XXIX). К 0.8 г пентапептидилполимера Boc-Gly-Pro-Arg-Gly-Gly-OP (VIII) прибавляли 3 мл диоксиана и 10 мл 0.2 н. раствора NaOH в 90% водном этаноле. Суспензию перемешивали 3 ч при 20°C, затем смолу отделяли, промывали 90% водным этанолом. Фильтрат подкисляли до pH 6. Растворители удаляли в вакууме, маслообразный остаток очищали хроматографически на колонке (2.5 × 40 см) с силикагелем 40/100, элюируя целевой продукт смесью хлороформ-метанол, 1 : 9. Выход пентапептида (IX) 0.11 г (36.0%), *R_f* 0.14 (Б), 0.46 (А), [α]_D²⁰ -61.0° (с 1, MeOH). ИК-спектр (вазелиновое масло), ν, см⁻¹: 3300 (-NH), 1720 (C=O, уретан), 1700 (-COOH), 1650 (амид I), 1620 (амид II). Аминокислотный анализ: Gly 2.6 (3), Arg 1.0 (1), Pro 1.1 (1). ВЭЖХ в условиях: колонка Spherisorb ODS (4.6 × 250 мм), элюция с градиентом от 15 до 75% за 40 мин раствора В в растворе А, рас-

твор А - 0.05 М водный раствор NaH₂PO₄, раствор В - 30% раствор А в ацетонитриле, детекция при 220 нм - индивидуальный пик, время удерживания 13.35 мин.

Соединение (XXIX) получали из 27.2 мг (44 мкмоль) пентапептида (IX) и 27.6 мг (44 мкмоль) производного порфирина (XXV) в присутствии 0.4 мг (3.2 мкмоль) ДМАР и 2.8 мкл (32 мкмоль) трихлорида фосфора и очищали аналогично соединению (XXVII). Выход 28.0 мг (54%), *R_f* 0.30 (В). Электронный спектр (хлороформ), λ_{max}, нм (lgε): 419.5 (5.328), 515.9 (3.93), 551.7 (3.62), 589.9 (3.45), 646 (3.34). Масс-спектр, *m/z*: [M + 2H]⁺ 1156.6. Аминокислотный анализ: Gly 3.0 (3), Pro 1.0 (1), Arg 0.98 (1).

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований за поддержку работы (проекты № 97-03-33158А и № 96-15-97709).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евстигнеева Р.П., Лубсандоржиева Л.К., Желтухина Г.А. // Докл. АН СССР. 1992. Т. 326. С. 452-455.
2. Евстигнеева Р.П., Рожкова Е.А., Желтухина Г.А., Лыско А.И., Лукьянова Л.Д. // Докл. РАН. 1995. Т. 342. С. 407-409.
3. Евстигнеева Р.П., Лубсандоржиева Л.К., Желтухина Г.А. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 664-669.
4. Радюхин В.А., Филиппович Е.И., Евстигнеева Р.П. // Журн. общ. химии. 1980. Т. 50. С. 673-678.
5. Schneider F. // Naturwissenschaften. 1978. V. 65. P. 376-381.
6. Boggaram V., Mannervik B. // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 701. P. 119-126.
7. Laudano A.P., Doolittle R.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 3085-3089.
8. Gisin B.F. // Helv. Chim. Acta. 1973. V. 56. P. 1476-1482.
9. Желтухина Г.А., Филиппович Е.И., Евстигнеева Р.П. А. с. 777025 СССР // Б. И. 1980. № 41.
10. Стюарт Дж., Янг Д. // Твердофазный синтез пептидов / Ред. Швачкин Ю.П. М.: Мир, 1971.
11. Kaiser E., Colescott R.L., Rossinger C.D., Cook P.Y. // Anal. Biochem. 1970. V. 34. P. 595-598.
12. Иванов А.Е., Сабуров В.В., Зубов В.П. // Журн. ВХО им. Д.И. Менделеева. 1989. Т. 34. С. 368-376.
13. Matthews S.E., Pouton C.W., Threadgill M.D. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1995. № 15. P. 1809-1811.
14. Гершкович А.А., Кибирев В.К. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 1461-1488.
15. Nagasawa T., Nakamura Y., Kuroiwa K. Novel Substrates for Use in Measuring the Concentration of Kallikrein in Urine. Pat. USA № 4650753. 435-23. 1987.
16. Nagasawa T., Nakamura Y., Enomoto T., Kuroiwa K. Novel Substrate for Determining the Activity of Blood

- Coagulation Factor XA (Stuart-prower factor). Pat. USA № 4622389. 530-331. 1986.
17. *Rasnick D.W., Bissell E.R.* 7-Amino-4-trifluoromethylquinolone Derived Substrates and Method for Determining Enzymes and Inhibitors. Pat. USA № 4505852. 530-329. 1985.
 18. *Kasafirek E., Chavko M., Bartik M.* // Collect. Czech. Chem. Commun. 1971. V. 36. P. 4070–4074.
 19. *Унковский В.И., Васильева Г.А., Евстигнеева Р.П.* // Журн. общ. химии. 1982. Т. 52. С. 1906–1910.
 20. *Бейли Дж.* // Методы химии белков / Ред. Браунштейн А.Е. М.: Мир, 1965.
 21. *Bayle-Lacoste M., De Tinguuy-Moreaud E., Geoffre S., Neuzil E.* // Int. J. Pept. and Prot. Res. 1987. V. 29. P. 392–405.
 22. *Gisin B.F.* // Anal. Chim. Acta. 1970. V. 34. P. 595–598.
 23. *Желтухина Г.А., Сидорова М.В., Филиппович Е.И., Евстигнеева Р.П.* // Журн. орган. химии. 1978. Т. 48. С. 1171–1172.

The Synthesis of Arg-Containing Peptides and Their Conjugates with Protohemin IX and Tetraphenylporphyrin

R. P. Evstigneeva, G. A. Zheltukhina[#], V. Khalil', and E. I. Efimova

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

Arg-containing peptides and their conjugates with protohemin IX were synthesized by the solid phase method using Merrifield resin. The conjugates of Arg-containing peptides with tetraphenylporphyrin were obtained by using phosphorus trichloride as an activating agent.

Key words: peptides, Arg-containing; hemin; porphyrin; heminpeptide; polymer support; solid phase synthesis

[#] *To whom correspondence should be addressed.*