



УДК 577.112.6

# СРАВНЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПИПЕРИДИНУ ДЕБЛОКИРУЮЩИХ АГЕНТОВ В ТВЕРДОФАЗНОМ СИНТЕЗЕ ИНГРАМОНА И МЕТИЛИНА<sup>1</sup>

© 2025 г. М. В. Климова\*, \*\*, #, А. С. Молокоедов\*\*, М. В. Овчинников\*\*,  
М. Е. Палькеева\*\*, У. С. Кожокарь\*\*, Д. В. Авдеев\*\*, М. В. Сидорова\*\*

\* ФГБОУ ВО “Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского  
(Первый казачий университет)”

Россия, 109004 Москва, ул. Земляной Вал, 73

\*\* ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова”  
Минздрава России,

Россия, 121552 Москва, ул. Академика Чазова, 15а

Поступила в редакцию 30.01.2025

После доработки 14.02.2025

Принята к публикации 15.02.2025

Работа посвящена сравнению альтернативных пиперидину деблокирующих агентов на примере твердофазного синтеза инграмона, обладающего противовоспалительной активностью, и метилина – агониста трансмембранного APJ-рецептора. Возможность применения этих пептидов для терапии сердечно-сосудистых заболеваний предполагает оптимизацию способов их синтеза. Особое внимание в работе уделено выбору реагента для снятия Fmoc-защиты в твердофазном синтезе пептидов, который обеспечивал бы высокий выход и чистоту целевого продукта с минимальным количеством родственных примесей. При синтезе аспартил-пептида инграмона наименьшее содержание побочных продуктов было отмечено при использовании для отщепления Fmoc-защиты смеси, содержащей 10% пиперазина. Кроме того, пиперазин – это доступный и малотоксичный реагент, что привлекательно для крупномасштабного твердофазного синтеза пептидов. При синтезе метилина максимальный выход продукта был получен при использовании деблокирующей смеси на основе пирролидина. Подобранные деблокирующие реагенты могут успешно заменить токсичный пиперидин в твердофазном синтезе пептидов не только в лабораторном, но и в препаративном масштабе. Эти реагенты могут найти применение при получении пептидных фармацевтических субстанций.

**Ключевые слова:** твердофазный синтез пептидов, реагенты для отщепления Fmoc-группы, инграмон, метилин, образование аспартимида, образование дикетопиперазина, 4-метилпиперидин, пирролидин, пиперазин

**DOI:** 10.31857/S0132342325040126, **EDN:** LNYGJD

## ВВЕДЕНИЕ

Рост числа терапевтических препаратов пептидной природы на фармацевтическом рынке [1–3] вызвал необходимость оптимизации и экологизации процесса их химического получения [4]. Се-

годня, наряду с повышением требований к качеству сырья и исходных материалов, к эффективности используемых методов синтеза и анализа пептидов, большое внимание уделяется поиску более “экологичных альтернатив” их получения, в том числе замене проблемных реагентов и раст-

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0132342325040126 для авторизованных пользователей. Сокращения: Asi – аспартиמיד; Boc – трет-бутилоксикарбонил; DBF – дибензофульвен; DBU – 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен; DCM – дихлорметан; DKP – дикетопиперазин; DIEA – N,N-диизопропилэтиламин; DIC – N,N'-диизопропилкарбодиимид; ESI – ионизация распылением в электрическом поле; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; MALDI – масс-спектрометрия методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации; 4-MePip – 4-метилпиперидин; NMM – N-метилморфолин; NMP – N-метилпирролидон; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; Piv – пирролидин; PZ – пиперазин; TBUTU – N,N,N',N'-тетраметил-O-(бензотриазол-1-ил)уруния тетрафторборат; TIS – триизопропилсилан; TFA – трифторуксусная кислота; Trt – тритил; Z – бензилоксикарбонил; ТФС – твердофазный синтез.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 414-67-16, эл. почта: peptide-cardio@yandex.ru).

ворителей менее токсичными аналогами. Твердофазный синтез пептидов (ТФС) с применением Fmoc-методологии в настоящее время широко используется для получения фармацевтических субстанций [5]. Успешное применение Fmoc-протоколов ТФС предполагает эффективное выполнение двух повторяющихся этапов, а именно включения Fmoc-защищенных аминокислот в растущую пептидную цепь, прикрепленную к твердой подложке (конденсация), и удаления Fmoc-защиты с использованием основания после каждой конденсации. Fmoc-группа представляет собой временную защиту  $\alpha$ -аминогруппы аминокислот, которая быстро удаляется избытком различных первичных или вторичных аминов в относительно полярных растворителях [6, 7]. Удаление группы Fmoc происходит в две стадии: 1) отщепление кислотного протона в положении 9-флуореновой кольцевой системы мягким основанием; 2) последующее  $\beta$ -элиминирование с образованием реакционноспособного промежуточного соединения дибензофульвена (DBF) [7], склонного к реакциям полимеризации, приводящим к получению нерастворимых агрегатов [8]. Установлено, что циклические вторичные амины не только быстро удаляют Fmoc-защиту, но и эффективно связывают DBF с образованием стабильных аддуктов [9], поэтому в автоматическом варианте ТФС пептидов используют именно их. Доступность пиперидина [6, 7], традиционно применяемого для деблокирования  $\alpha$ -аминогрупп в ТФС пептидов, в настоящее время существенно ограничена, т.к. этот реагент имеет статус контролируемого вещества и включен в Красный список Международного комитета по контролю над наркотиками [10, 11]. Поэтому работы по поиску и изучению альтернативных пиперидину деблокирующих агентов, пригодных для ТФС, остаются актуальными.

Данная работа – продолжение наших исследований [12]. Целью настоящей работы была сравнительная оценка деблокирующих агентов на базе ряда циклических вторичных аминов и изучение возможности их применения для ТФС пептидов различной структуры, в частности инграмона – фрагмента (65–76) моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) человека H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH, выступающего его антагонистом [13], и метилина H-(N<sup>α</sup>Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-

Nle-Pro-Phe-OH – модифицированного агониста APJ рецептора апелина-12 [14]. Эти пептиды впервые получены в ФГБУ “НМИЦ кардиологии им. акад. Е.И. Чазова” Минздрава России [13, 14]. Возможность применения этих пептидов для терапии сердечно-сосудистых заболеваний предполагает оптимизацию способов их синтеза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При выборе реагента для отщепления Fmoc-защиты в ходе ТФС необходимо учитывать ряд факторов: основность ( $pK_a$ ), концентрацию и время, необходимые для эффективного отщепления защиты, доступность реагента, его токсичность и возможность утилизации остатков. Кроме того, следует также оценивать возможность образования нежелательных побочных продуктов под действием выбранных оснований.

Наиболее заметные побочные реакции, опосредованные основанием в Fmoc-ТФС, – это образование аспартимида в пептидах, содержащих аспарагиновую кислоту [15], и дикетопиперазина в пептидах, содержащих аминокислоты со вторичной аминогруппой (Pro, Nur, Tic, Oic) или *N*-алкиламинокислоты в качестве *C*-концевых или находящиеся во второй позиции с *C*-конца [16]. Выбранные нами пептиды содержат в своих последовательностях проблемные остатки – это Asp в инграмоне и Pro в *C*-концевой части метилина.

Образование аспартимида происходит путем циклизации боковой цепи Asp с пептидным остовом [17], в процессе Fmoc-ТФС реакция катализируется основанием на стадии деблокирования  $\alpha$ -аминогрупп пептидилполимера.

Эта побочная реакция представляет серьезную проблему при ТФС аспартилпептидов, поскольку промежуточное циклическое соединение Asi в ходе синтеза накапливается, а затем может подвергаться эимеризации с образованием примесей соответствующих диастереомерных пептидов и гидролизу с образованием изомерных целевого  $\alpha$ - и побочного  $\beta$ -аспартилпептидов. Такие близкородственные примеси трудно отделить при последующей очистке. Образование аспартимида зависит от последовательности и особенно выражено, когда остаток аспарагиновой кислоты расположен рядом с аминокислотой с низкими стерическими затруднениями, например, глицином [15]. Ранее нами было показано, что образование

аспартимида происходит при ТФС инграмона в последовательности  $\text{Asp}^4\text{--Lys}^5$  [18], хотя эта последовательность и не “критична”. Схема происходящих при этом превращений приведена в дополнительных материалах (схема S1). Идентификация основных примесей, образующихся при синтезе инграмона (с помощью спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР, масс-спектрометрии и встречного синтеза), показала, что они появляются вследствие образования аспартимида на стадии деблокирования  $\alpha$ -аминогруппы пептидилполимера и последующих процессов, происходящих с раскрытием сукцинильного цикла, и представляют собой  $[\text{Asi}^4]$ -,  $[\text{D-Asp}^4]$ - и  $[\beta\text{-Asp}^4]$ -аналоги инграмона [18].

Образование дикетопиперазина (схема 1) – хорошо известная побочная реакция в ТФС.

В то время как образование аспартимида происходит непрерывно во время синтеза, образование DKP в основном происходит при удалении Fmoc-защиты на стадии дипептидилполимера [16]. Степень образования DKP зависит от нескольких факторов, решающим из которых выступает потенциальное предпочтение *цис*-конфигурации амидной связи между двумя соседними аминокислотами, задействованными в образовании DKP [19]. Эта побочная реакция актуальна, когда C-концевая или вторая с C-конца аминокислота представляет собой аминокислоту со вторичной аминогруппой, как у остатка пролина, его аналогов, циклических аминокислот, или *N*-алкиламинокислот [16]. Значение имеет также якорная группа полимерного носителя.

Так, смолы со сложноэфирными линкерами и низкими стерическими затруднениями (например, линкерами Ванга) особенно восприимчивы к образованию DKP [20]. При этом нуклеофильная атака свободного амина по сложноэфирной связи приводит к отщеплению дипептида от смолы. Образовавшийся DKP можно “вымыть”, и это не повлияет на чистоту неочищенного пептида, но фактически приведет к потере пептида и снижению выхода. В таком случае образование C-концевого DKP называют “бесследным” образованием DKP, поскольку его появление не может быть отражено профилем примесей целевого пептидного продукта и обычно игнорируется.

Для изучения пригодности альтернативных пиперидину деблокирующих реагентов нами были выбраны три доступных циклических вторичных амина, характеристики которых представлены в табл. 1. Кроме этих оснований в состав некоторых смесей был включен третичный амин DBU – 1,8-диазабицикло[5.4.0]-ундец-7-ен, который часто применяется в ТФС и хорошо зарекомендовал себя в нашей работе при синтезе фрагмента аминокислотной последовательности регуляторной легкой цепи миозина H-Lys-Lys-Arg-Ala-Ala-Arg-Ala-Thr-Ser-NH<sub>2</sub> (MLC11-19) и антагониста окситоциновых рецепторов атосибана [12].

На первом этапе работы мы провели оценку скорости отщепления Fmoc-защиты выбранными основаниями на модели Fmoc-Phe-полимера Ванга. Отщепление Fmoc-защиты в ТФС обычно отслеживают путем спектрофотометрического из-

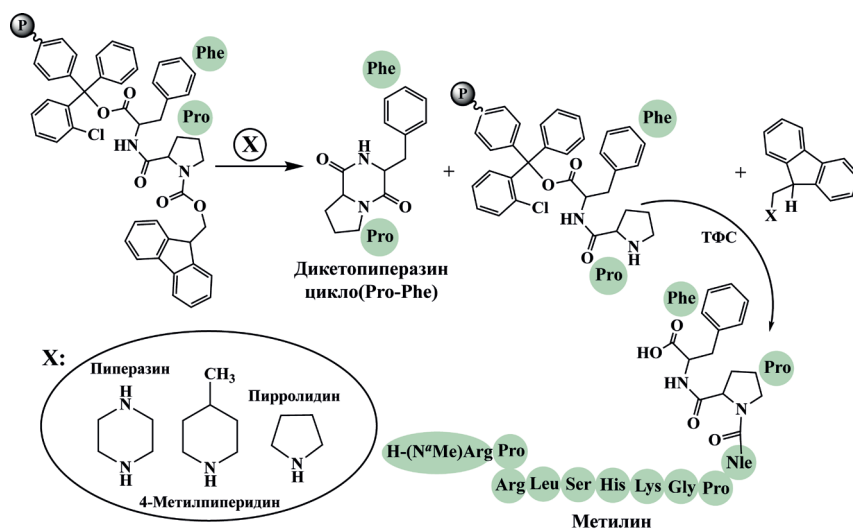


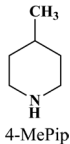

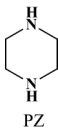
Схема 1. Образование дикетопиперазина в синтезе метилина.

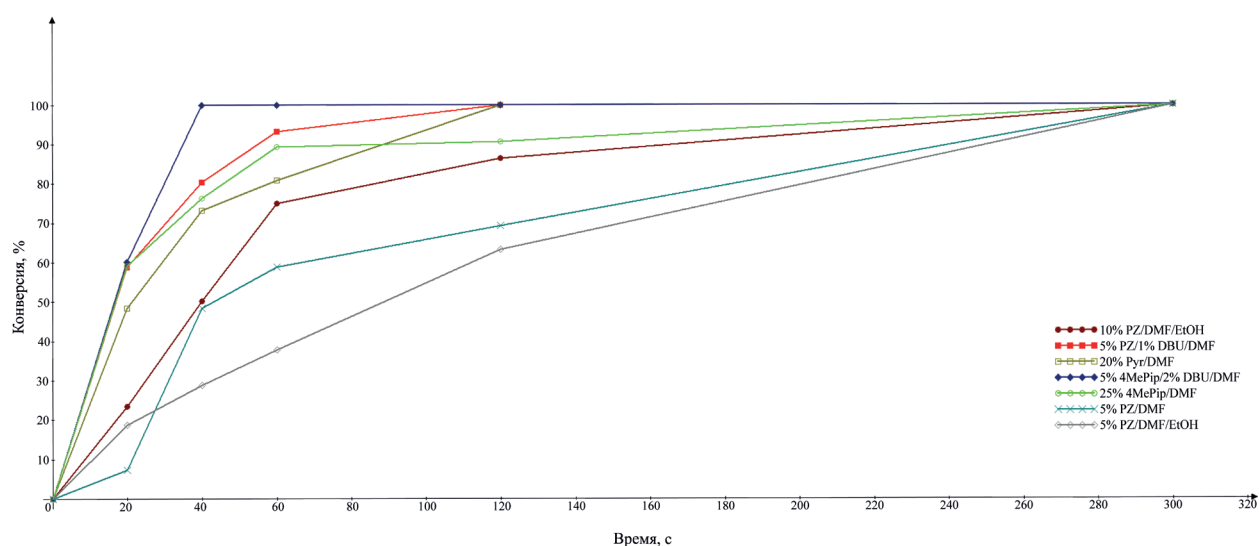
мерения концентрации образующегося в реакционной смеси аддукта DBF–нуклеофил (при 301 нм) [22, 23]. Мы предположили, что этот метод можно использовать для сравнительной оценки кинетики отщепления Fmoc-защиты различными реагентами при торможении этой реакции в момент отбора аликвоты реакционной смеси в заданный момент времени. Для этого отбираемые аликвоты реакционной смеси немедленно фильтровали для отделения смолы. Поглощение при 301 нм регистрировали для каждой аликвоты, что позволяло судить о ходе деблокирования amino-

группы связанного с полимером остатка  $\text{Ple}$  и представляло собой степень отщепления Fmoc в определенный момент времени.

Полученные результаты приведены в табл. S1 (дополнительные материалы) и на рис. 1. Видно, что все использованные смеси эффективно отщепляют Fmoc-защиту и могут быть использованы в ТФС: в смесях без DBU реакция деблокирования аминогруппы  $\text{Ple}$  завершается в среднем за 120 с, добавление в деблокирующую смесь DBU в 2–3 раза сокращает время отщепления Fmoc-защиты (до 40–60 с).

**Таблица 1.** Характеристики использованных аминов

Формула	Название	$pK_a$ [21]	Токсичность $LD_{50}$ , мг/кг (для крыс)
 4-MePip	4-Метилпиперидин	10.78	4000
 Pyr	Пирролидин	11.27	433
 PZ	Пиперазин	9.82	1900



**Рис. 1.** Кинетика отщепления Fmoc-защиты (в %) при использовании различных деблокирующих смесей при комнатной температуре для модельного аминокислотного полимера Fmoc-Ple-P<sub>Wang</sub>.

В серии экспериментов, описанных ниже, мы провели сравнение выбранных деблокирующих реагентов при синтезе инграмона и оценили с помощью ВЭЖХ состав неочищенных продуктов ТФС. Во всех опытах ход синтеза оставался неизменным, за исключением стадии деблокирования. Для создания амидной связи применяли метод урониевых солей с использованием TBTU/NMM [24]. Для идентификации целевого пептида и примесей [Asi<sup>4</sup>]-, [D-Asp<sup>4</sup>]- и [β-Asp<sup>4</sup>]-инграмона мы использовали образцы соответствующих соединений, полученные и охарактеризованные нами ранее [18]. В табл. 2 представлены результаты, полученные при синтезе инграмона. Из табл. 2 видно, что использование такого сильного основания, как DBU, приводит к существенному увеличению содержания аспартимида в полученном продукте и составляет ~22% для смеси 5% 4MePip/2% DBU/DMF (опыт № 2, табл. 2) и ~10% для смеси 5% PZ/1% DBU/DMF (опыт № 4, табл. 2). Исключение DBU из деблокирующей смеси в разы снижает образование циклического имида (до 2–3%) (опыты № 2 и 5, табл. 2). Это наблюдение подтверждается литературными данными [25] о том, что применение даже небольших количеств DBU (1–2%) при отщеплении Fmoc сопровождается существенным образованием (D/L)-аспартимида. Проведенные эксперименты показали, что пирролидин и пиперазин в значительной степени снижают образование побочных продуктов и увеличивают содержание инграмона в продукте, а добавление 1-гидроксibenзотриазола в качестве дополнительного источника протона к смеси с 10%-ным пиперазином минимизирует образование Asi<sup>4</sup> (содержание аспартимида в этом случае менее

0.5%). Эти результаты не уступают ранее полученным с использованием 4-метилпиперидина, когда содержание основного вещества составляло 77.8%, а примесей – не более 3% [18]. Единственное отличие заключается в более высоком содержании D-Asp<sup>4</sup> (опыты № 1, 3–6, табл. 2), которое можно объяснить выбором метода урониевых солей вместо использования DIC/HOBt в опыте № 2 (табл. 2) [18].

Результаты синтеза инграмона по аналитической ВЭЖХ продемонстрированы на рис. S1 в дополнительных материалах.

Таким образом, для синтеза инграмона лучшие результаты были получены при использовании деблокирующей смеси на базе пиперазина с добавлением HOBt. PZ привлекателен для крупномасштабных синтезов, поскольку он доступен и представляет собой малотоксичное твердое вещество (табл. 1).

На примере синтеза метилина оценивали образование дикетопиперазина. Как было сказано выше, степень образования DKP в случае пептидов с остатком пролина в C-концевой части молекулы можно отслеживать по выходу целевого продукта в расчете на стартовую аминокислоту. Для ТФС метилина был выбран полимерный носитель со стерически затрудненной 2-хлортритильной якорной группой [16]. Результаты опытов с метилином представлены в табл. 3. Как в предыдущей серии опытов с инграмоном, так и в опытах с метилином наблюдается прямая зависимость качества продукта от присутствия в деблокирующей смеси DBU – при наличии основания выход пептида заметно меньше, чем без него.

**Таблица 2.** Влияние реагента для отщепления Fmoc-защитных групп на состав неочищенного продукта – инграмона

№ опыта	Деблокирующая смесь	Состав неочищенного продукта по ВЭЖХ, %			
		инграмон	примеси		
			D-Asp <sup>4</sup> *	Asi <sup>4</sup> *	β-Asp <sup>4</sup> **
1	5% 4MePip/2% DBU/DMF	66.21	4.60	21.92	1.24
2	25% 4MePip/DMF [18]	77.78	0.68	2.67	1.37
3	20% Pyr/DMF	85.47	5.11	3.03	1.12
4	5% PZ/1% DBU/DMF	77.13	4.45	10.07	1.60
5	10% PZ/DMF/EtOH	82.18	2.67	2.06	0.59
6	<b>10% PZ/DMF/EtOH/0.1M HOBt</b>	<b>87.63</b>	<b>2.65</b>	<b>&lt;0.50</b>	<b>0.60</b>

Примечание: данные, представленные в эксперименте опыта № 2, взяты из нашей ранее опубликованной работы [18]. Полужирным шрифтом выделены лучшие результаты.

\* pH 3.0; \*\* pH 5.95.



**Таблица 3.** Влияние реагента для отщепления Fmoc-защитных групп на чистоту и выход метилина

Деблокирующая смесь	Содержание метилина по ВЭЖХ, %		Выход продукта*, %
	в сыром продукте	в очищенном продукте	
5% 4MePip/2% DBU/DMF	84.80	98.42	50.50
25% 4MePip/DMF	80.75	98.60	64.00
<b>20% Pyr/DMF</b>	<b>81.35</b>	<b>98.45</b>	<b>72.10</b>
5% PZ/2% DBU/DMF	85.38	98.50	62.40

Примечание: полужирным шрифтом выделены лучшие результаты.

\* Приведены суммарные выходы пептида в расчете на содержание стартовой аминокислоты, присоединенной к полимеру.

Самый высокий выход метилина был получен при использовании деблокирующей смеси на основе пирролидина. По всей вероятности, это можно объяснить самым высоким показателем  $pK_a$  реагента (11.27) и высокой скоростью отщепления Fmoc-защиты (см. табл. S1 в дополнительных материалах или рис. 1) и, следовательно, минимальным временем щелочной обработки дипептидполимера и минимальной потерей пептидных цепей за счет образования DKP.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы и приборы.** В работе использовали производные аминокислот L-ряда: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Thr(Bu')-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(Bu')-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-(Me)Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-His(Trt)-OH (BLD Pharm, Китай); диметилформамид (DMF), *N*-метилморфолин (NMM), *N,N'*-диизопропилкарбодиимид (DIC), 1-гидроксibenзотриазол (HOBt), *N,N,N',N'*-тетраметил-*O*-(бензотриазол-1-ил)урония тетрафторборат (TBTU), триизопропилсилан (TIS), трифторуксусную кислоту (TFA) (Fluka, Швейцария); 4-метилпиперидин (TCI, Китай), пирролидин (РеаХимЛаб, Россия), пиперазин (ФармСтандарт, Россия), 1,8-дизабицикло[5.4.0]-ундец-7-ен (DBU) (Acros Organic, Германия). Для ВЭЖХ применяли ацетонитрил (CH<sub>3</sub>CN; Carl Roth GmbH, Германия).

Аналитическую ВЭЖХ инграмона проводили на хроматографе Knauer (Германия) на колонке (4.6 × 250 мм) Kromasil 100-5 C18 (Швеция), размер частиц сорбента 5 мкм, размер пор 100 Å. В качестве элюентов использовали буфер А – 0.05 М КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, pH 3.0 (условия 1) или 0.05 М КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, pH 5.95 (условия 2); в условиях 1 и 2 буфер Б –

70%-ный ацетонитрил в буфере А. Элюцию осуществляли со скоростью 1 мл/мин в градиенте концентрации буфера Б в буфере А от 0 до 40% за 40 мин, детекцию – при длине волны 220 нм.

Аналитическую ВЭЖХ метилина проводили на приборе Knauer (Германия) на колонке Диасфер 110-С-18 (Россия) (4.0 × 250 мм), размер частиц сорбента 5 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А – 0.05 М КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, pH 3.0, буфер Б – 70%-ный ацетонитрил в буфере А. Элюцию осуществляли со скоростью 0.75 мл/мин в градиенте концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80% за 30 мин, детекцию – при длине волны 220 нм.

Препаративную ВЭЖХ метилина проводили на приборе Gilson (Франция) на колонке Kromasil-C18 (Швеция) (30 × 250 мм), с размером частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А – 0.01 М водный раствор ацетата аммония, pH 4.5, содержащий 3–5% ацетонитрила, буфер Б – 70%-ный ацетонитрил в буфере А. Элюцию проводили от 100% буфера А в градиенте концентрации 0.5 %/мин буфера Б со скоростью 20 мл/мин. Фракции, соответствующие целевому веществу, объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизовали.

Структуру пептидов подтверждали методами протонного магнитного резонанса (<sup>1</sup>H-ЯМР) и масс-спектрометрии. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР регистрировали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц (Германия) в DMSO-*d*<sub>6</sub> при 300 К. Химические сдвиги измеряли относительно тетраметилсилана. Данные масс-спектрометрии получали на приборе Amazon (Bruker Daltonik GmbH, Германия) методом электрораспылительной ионизации (ESI) в режиме регистрации положительных ионов (напряжение на капилляре – 3500В). Диапазон сканирования *m/z* – 70–2200.

**Кинетика отщепления Fmoc-защиты.** Для сравнительной оценки кинетики отщепления Fmoc-защиты различными реагентами использовали Fmoc-Phe-P<sub>Wang</sub>. К 50 мг аминокислотполимера (точная навеска) добавляли 5 мл деблокирующей смеси и перемешивали, в заданные моменты времени (20, 40, 60, 120, 300 с и т.д.) отбирали аликвоты реакционной смеси по 100 мкл и немедленно фильтровали через наконечник с фильтром для удаления частиц смолы. Полученный фильтрат (50 мкл) разбавляли деблокирующим раствором до 3 мл и (после вычитания поглощения использованной деблокирующей смеси) определяли поглощение аддукта дибензофульвена при 301 нм на спектрофотометре Jenway UV/VIS 6705 (Англия), использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см. Расчеты концентрации DBF выполняли с использованием молярного коэффициента поглощения ( $\epsilon_{301}$ ) – 7800 дм<sup>3</sup> моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> для  $\lambda$  = 301 нм [22, 23] по формуле [23]:

$$C = \frac{A_{301} V 10^6}{\epsilon m l},$$

где  $C$  – концентрация аддукта DBF – основание, ммоль/г;  $A$  – значение поглощения при 301 нм;  $V$  – объем раствора, дм<sup>3</sup>;  $\epsilon$  – молярный коэффициент поглощения, дм<sup>3</sup> моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>;  $m$  – навеска смолы, мг;  $l$  – длина кюветы, см;  $10^6$  – коэффициент перевода моль в ммоль и мг в г.

Сбор и анализ аликвот продолжали до тех пор, пока поглощение при 301 нм не достигало плато – это значение принимали за 100%-ное отщепление Fmoc-защиты.

**Твердофазный синтез пептидов. Инграмон.** H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH.

Автоматический синтез пептида проводили на синтезаторе Tribute-UV (Protein Technologies Inc., США) с использованием полимерного носителя (Iris Biotech, ФРГ) с 2-хлор-третилхлоридной (2-CTC) якорной группой, содержащего 1.3 экв. Cl/г 2-CTC-полимера. Стартовую аминокислоту присоединяли по стандартной методике [26]. При синтезе инграмона исходили из 0.625 г (0.375 ммоль) Fmoc-Thr(Bu<sup>t</sup>)-2-CTC-полимера со степенью замещения стартовой аминокислотой 0.6 ммоль/г. Для деблокирования  $\alpha$ -аминогруппы использовали 2–3 обработки растворами 5% 4-MePip/2% DBU/DMF, 20% Pyr/DMF, 5% PZ/1% DBU/DMF, 10% PZ/DMF/EtOH, 10% PZ/DMF/EtOH/0.1M HOBT в течение 2–3 мин. Программа деблокирования пептидилполимера

включала функцию обратной связи со спектрофотометрическим контролем полноты отщепления Fmoc-защиты. Для создания амидной связи использовали 0.482 г (1.50 ммоль) TBTU в присутствии 0.33 мл NMM (3.00 ммоль).

По окончании синтеза пептид отщепляли от полимера с одновременным деблокированием функциональных групп аминокислот смесью TFA : TIS : H<sub>2</sub>O в соотношении 90 : 5 : 5 в течение 1.5 ч. Полимер отфильтровывали, промывали отщепляющей смесью, фильтрат упаривали, полученный маслообразный продукт осаждали диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром. Полученный сырой продукт анализировали с помощью ВЭЖХ, как описано выше.

**Метилин.** H-(N<sup>o</sup>Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH.

Автоматический синтез пептида проводили на синтезаторе Tribute-UV с использованием полимерного носителя (Iris Biotech, ФРГ) с 2-хлор-третилхлоридной (2-CTC) якорной группой, содержащего 1.3 экв. Cl/г 2-CTC-полимера. Стартовую аминокислоту присоединяли по стандартной методике [26]. При синтезе метилина исходили из 0.51 г (0.375 ммоль) Fmoc-Phe-2-CTC-полимера со степенью замещения стартовой аминокислотой 0.73 ммоль/г. Для деблокирования  $\alpha$ -аминогруппы использовали 2–3 обработки растворами 5% 4-MePip/2% DBU/DMF, 20% Pyr/DMF, 5% PZ/2% DBU/DMF в течение 2–3 мин. Программа деблокирования пептидилполимера включала функцию обратной связи со спектрофотометрическим контролем полноты отщепления Fmoc-защиты. Для создания амидной связи использовали 0.482 г (1.50 ммоль) TBTU в присутствии 0.33 мл NMM (3.00 ммоль).

По окончании синтеза пептид отщепляли от полимера с одновременным деблокированием функциональных групп аминокислот смесью TFA : TIS : H<sub>2</sub>O в соотношении 90 : 5 : 5 в течение 1.5 ч. Полимер отфильтровывали, промывали отщепляющей смесью, фильтрат упаривали, полученный маслообразный продукт осаждали диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром. Полученный сырой продукт анализировали и очищали с помощью ВЭЖХ, как описано выше. Чистота и выходы пептида приведены в табл. 3. ESI<sup>+</sup>: найдено  $m/z$  – 355.44<sup>+</sup>, 473.82<sup>3+</sup>, 710.05<sup>2+</sup>; вычислено для C<sub>66</sub>H<sub>107</sub>N<sub>21</sub>O<sub>14</sub> – 355.47<sup>4+</sup>, 473.62<sup>3+</sup>, 709.92<sup>2+</sup>.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе на примере ТФС инграмона и метилина проведена сравнительная оценка циклических вторичных аминов, альтернативных токсичному пиперидину. По результатам исследования был сделан вывод, что 4-метилпиперидин, пирролидин и пиперазин можно использовать взаимозаменяемо с пиперидином. Следует отметить, что низкотоксичный и легкодоступный пиперазин, редко применяемый в ТФС, показал очень хорошие результаты для синтеза аспартилпептида инграмона и выступает достойной альтернативой пиперидину. Кроме того, показано, что при синтезе пептидов, содержащих остатки аспарагиновой кислоты и пролина в С-концевой части молекулы, следует избегать использования DBU в составе смесей для отщепления Fmoc-защиты, т.к. в первом случае это приводит к повышенному образованию аспартимида, а в пролиновых пептидах – к потере пептидных цепей в ходе ТФС и, как следствие, к снижению выхода целевого продукта.

Возможность использования инграмона и метилина для терапии сердечно-сосудистых заболеваний требует оптимизации способов их синтеза. Нами разработаны методики синтеза этих пептидов, позволяющие получать их с высоким выходом и низким содержанием родственных примесей. Доступные деблокирующие реагенты PZ и Pуг могут быть успешно использованы для крупномасштабного синтеза инграмона и метилина соответственно, а также других физиологически активных пептидов.

Полученные результаты принципиально важны для организации в ФГБУ “НМИЦ кардиологии” Минздрава России экспериментального производства инграмона и метилина и запланированных доклинических и клинических испытаний.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (рег. № НИОКТР 124013000813-3 и 125022803024-3).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – MBK, MBO, MBC; экспериментальные работы – MBK, MEP, YCK, DBA, ACM; написание статьи – MBK, MBC; анализ данных – ACM, MBK, MBC; администрирование проекта – MBC.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

## ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vlieghe P., Lisowski V., Martinez J., Khrestchatsky M.* // Drug Discov. Today. 2010. V. 15. P. 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.009>
2. *Fosgerau K., Hoffmann T.* // Drug Discov. Today. 2015. V. 20. P. 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
3. *de la Torre B.G., Albericio F.* // Molecules. 2023. V. 28. P. 1038. <https://doi.org/10.3390/molecules28031038>
4. *Bruckdorfer T., Marder O., Albericio F.* // Curr. Pharm. Biotechnol. 2004. V. 5. P. 29–43. <https://doi.org/10.2174/1389201043489620>
5. *Behrendt R., White P., Offer J.* // J. Pept. Sci. 2016. V. 22. P. 4–27. <https://doi.org/10.1002/psc.2836>
6. *Li W., O'Brien-Simpson N.M., Hossain M.A., Wade J.D.* // Aust. J. Chem. 2020. V. 73. P. 271–276. <https://doi.org/10.1071/CH19427>
7. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach* / Eds. Chan W.C., White P.D. Oxford University Press, 1999. <https://doi.org/10.1093/oso/9780199637256.001.0001>
8. *Carpino L.A.* // Acc. Chem. Res. 1987. V. 20. P. 401–407.
9. *Luna O.F., Gomez J., Cárdenas C., Albericio F., Marshall S.H., Guzmán F.* // Molecules. 2016. V. 21. P. 1542. <https://doi.org/10.3390/molecules21111542>
10. Drug Enforcement Administration (DEA), Department of Justice. Control of immediate precursor used in the illicit manufacture of fentanyl as a schedule II controlled substance. Final rule. Fed Regist. 2010. V. 75. P. 37295–37299. <https://www.federalregister.gov/documents/2010/06/29/2010-15520/control-of-immediate-precursor-used-in-the-illicit-manufacture-of-fentanyl-as-a-schedule-ii>



11. List of Precursors and chemicals Frequently used in the illicit manufacture of narcotic drugs and psychotropic substances under International Control. [https://incb.org/documents/PRECURSORS/RED\\_LIST/2020/Red\\_List\\_2020\\_E.pdf](https://incb.org/documents/PRECURSORS/RED_LIST/2020/Red_List_2020_E.pdf)
12. Петропавловская М.В., Палькеева М.Е., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Сидорова М.В. // Хим.-фарм. журн. 2024. Т. 58. С. 38–43. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2024-58-3-38-43>
13. Sidorova M.V., Molokoedov A.S., Aref'eva T.I., Kukhtina N.B., Krasnikova T.I., Beshpalova Zh.D., Bushuev V.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 523–533. <https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000049768.98894.f5>
14. Sidorova M.V., Az'muko A.A., Pal'keeva M.E., Molokoedov A.S., Bushuev V.N., Dvoryantsev S.N., Shulzhenko V.S., Pelogeykina Y.A., Pisarenko O.I., Beshpalova Zh.D. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2012. V. 38. P. 30–40. <https://doi.org/10.1134/S1068162012010177>
15. Lauer J.L., Fields C.G., Fields G.B. // Lett. Pept. Sci. 1995. V. 1. P. 197–205.
16. Yang Y., Hansen L. // ACS Omega. 2022. V. 7. P. 12015–12020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00214>
17. Wade J.D., Mathieu M.N., Macris M., Tregear G.W. // Lett. Pept. Sci. 2000. V. 7. P. 107–112. <https://doi.org/10.1023/A:1008966207751>
18. Sidorova M.V., Dudkina U.S., Avdeev D.V., Pal'keeva M.E., Molokoedov A.S., Ovchinnikov M.V., Azmuko A.A., Bushuev V.N., Arefieva T.I., Grechishnikov S.B., Kudryavtseva E.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 520–529. <https://doi.org/10.1134/S1068162020040202>
19. Craveur P., Joseph A.P., Poulain P., de Brevern A.G., Rebehmed J. // Amino Acids. 2013. V. 45. P. 279–289. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1511-3>
20. Pedroso E., Grandas A., de las Heras X., Eritja R., Giralt E. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 743–746.
21. pK<sub>a</sub> data compiled by Williams R. American Chemical Society, Organic Division, 2022. <https://organicchemistrydata.org/hanschreich/resources/pka/>
22. Eissler S., Kley M., Bächle D., Loidl G., Meiera T., Samson D. // J. Pept. Sci. 2017. V. 23. P. 757–762. <https://doi.org/10.1002/psc.3021>
23. Szczepanska E., Grobelna B., Ryl J., Kulpa A., Ossowski T., Niedziałkowski P. // Molecules. 2020. V. 25. P. 3983. <https://doi.org/10.3390/molecules25173983>
24. Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillessen D. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. P. 1927–1930.
25. Ralhan K., KrishnaKumar V.G., Gupta Sh. // RSC Adv. 2015. V. 5. P. 104417. <https://doi.org/10.1039/c5ra23441g>
26. Barlos K., Gatos D. // Convergent Peptide Synthesis. In: Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach / Eds. Chan W.C., White P.D. Oxford University Press, 2000. P. 215–228.

## Comparison of Alternative Piperidine Deblocking Agents in Solid-Phase Synthesis of Ingramon and Methylin

M. V. Klimova\*, \*\*, #, A. S. Molokoedov\*\*, M. V. Ovchinnikov\*\*, M. E. Palkeeva\*\*,  
U. S. Kozhokar\*\*, D. V. Avdeev\*\*, and M. V. Sidorova\*\*

# Phone: +7 (499) 414-67-16; e-mail: peptide-cardio@yandex.ru

\* Razumovsky Moscow State University of Technology and Management,  
ul. Zemlyanoi val 73, Moscow, 109004 Russia

\*\* Chazov National Medical Research Center of Cardiology, ul. Akad. Chazova 15a, Moscow, 121552 Russia

The work is devoted to the comparison of alternative piperidine deblocking agents using the examples of solid-phase synthesis of ingramon, which has anti-inflammatory activity, and methylin, an agonist of the transmembrane APJ receptor. The possibility of using these peptides for the treatment of cardiovascular diseases dictates the need to develop optimized methods for their synthesis. Particular attention in the work is paid to the choice of a reagent for removing Fmoc protection in solid-phase peptide synthesis, which would ensure a high yield and purity of the target product with a minimum amount of related impurities. In the synthesis of the aspartyl peptide ingramon, the lowest content of by-products was noted when using a mixture containing 10% piperazine for cleaving the Fmoc protection. In addition, piperazine is an accessible and low-toxic reagent, which is attractive for large-scale solid-phase peptide synthesis. In the synthesis of methylin, the maximum yield of the product was obtained using a deblocking mixture based on pyrrolidine. The selected deblocking reagents can successfully replace toxic piperidine in solid-phase peptide synthesis not only in the laboratory but also in the preparative scale. These reagents can find application in obtaining peptide pharmaceutical substances.

*Keywords: solid-phase peptide synthesis, reagents for Fmoc-cleavage, ingramon, methylin, aspartimide formation, diketopiperazine formation, 4-methylpiperidine, pyrrolidine, piperazine*