

УДК 577.112.6
©Коллектив авторов

СИНТЕЗ ФРАГМЕНТА β -АМИЛОИДА 5 RHDSGY 10 И ЕГО ИЗОМЕРОВ

*Е.Ю. Алешина**, *Н.В. Пындык*, *А.А. Мойса*, *М.А. Санжаков*, *О.Н. Харыбин*,
Е.Н. Николаев, *Е.Ф. Колесанова*

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121 Москва,
ул. Погодинская, д. 10; тел.: 246-33-75; факс: 8-495-245-08-57;
эл. почта: elena.aleshina@ibmc.msk.ru

Пептид RHDSGY, представляющий собой фрагмент цинк-связывающего участка β -амилоида человека, и его изомеры RH(D-Asp)SGY и RH(β -Asp)SGY были получены в виде амидов путем твердофазного синтеза; проведен анализ полученных препаратов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и различных методов масс-спектрометрии. Проблема низкого выхода пептида RHDSGY и его изомеров в стандартных условиях синтеза, исходя из 9-флуоренилметоксикарбонил(Fmoc)-аминокислот и/или образования в ходе синтеза этого пептида таких побочных продуктов, как RH(β -Asp)SGY (или, соответственно, RHDSGY при синтезе RH(β -Asp)SGY) и RH(Asp-имид)SGY, была решена путем индивидуального подбора реагентов для удаления защитных Fmoc-групп с α -аминогрупп растущей пептидной цепи.

Ключевые слова: β -амилоид, твердофазный пептидный синтез, β -Asp, удаление Fmoc-группы.

ВВЕДЕНИЕ. Болезнь Альцгеймера - одна из наиболее частых причин деменции в пожилом и старческом возрасте. Основным гистологическим признаком болезни Альцгеймера является накопление в мозге т.н. сенильных бляшек, состоящих в основном из β -амилоида и его фрагмента (1-42) [1, 2]. Одна из гипотез связывает образование бляшек с изомеризацией остатков аспарагиновой кислоты в цинк-связывающем участке β -амилоида, что приводит к изменению конформации этого белка и его агрегации [3, 4]. В этом случае фрагменты β -амилоида, содержащие остаток изоаспарагиновой кислоты, могли бы служить биомаркерами заболевания, а их выявление - использоваться для ранней

* - адресат для переписки

СИНТЕЗ ФРАГМЕНТА β -АМИЛОИДА

диагностики болезни Альцгеймера [5]. Одним из таких биомаркеров может быть триптический фрагмент β -амилоида, 5RHDSGY10, в котором находится остаток Asp7, способный к эпимеризации в составе более крупных фрагментов и целого амилоида [3, 4]. Для разработки метода масс-спектрометрического определения этого фрагмента β -амилоида с остатком Asp7 в двух эпимерных формах необходимо было синтезировать соответствующие тестовые пептиды, RHDSGY и RH β -DSGY (β -D - остаток изоаспарагиновой кислоты) и пептид сравнения RHdSGY (d - D-Asp), в котором остаток D-Asp не способен к эпимеризации. Следует отметить, что для пептида RHDSGY может быть характерна высокая вероятность эпимеризации остатка Asp в β -Asp в ходе синтеза через катализируемое кислотами или основаниями образование аспартимида [6]. При синтезе пептидов, содержащих пары Asp-Ser, Asp-Gly, Asp-Ala, Asp-Asp, Asp-Asn, с использованием 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc)-защищенных по α -аминогруппам аминокислот на стадии удаления Fmoc-групп с растущей пептидной цепи вместо обычно применяемого 20%-ного (по объему) раствора пиперидина (PIP) используют реагенты с меньшей основностью, например, пиперазин и морфолин [7, 8]. Однако эти реагенты являются менее эффективными деблокаторами Fmoc-защищенных α -аминогрупп, чем PIP, и полное удаление Fmoc-групп достигается путем повторения реакций деблокирования и/или использования более чем 5-кратного избытка реагентов [7]. Тем не менее, это не всегда помогает в увеличении выхода целевых продуктов и, кроме того, не исключает появления побочных продуктов [6, 8]. В данной работе был проведен твердофазный синтез фрагмента β -амилоида, 5RHDSGY10, и двух его оптических изомеров в виде амидов с использованием различных реагентов для деблокирования Fmoc-защищенных α -аминогрупп, что позволило выбрать оптимальные способы синтеза каждого из пептидов.

МЕТОДИКА.

Реагенты и растворители: В работе использовали N α -Fmoc-производные аминокислот L-ряда, а также D- и изоаспарагиновой кислоты, 1-гидроксibenзотриазол (HOBT) ("Novabiochem", Швейцария), 1,8-дiazобисцикло-5,4-ундец-7-ен (DBU), пирролидин (PYR), 4-метилпиперидин (4-MPIP), морфолин, 3,6-диокса-1,8-октандитиол (DODT), трифторуксусная кислота (TFA), N-метилпирролидон (NMP), изопропанол (IPA) ("Acros Organics", Бельгия), N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIPC), PIP, триизопропилсилан (TIS) ("Fluka", Швейцария), дихлорметан (DCM), метил-трет-бутиловый эфир (эфир) ("Merck", Германия), петролейный эфир, температура кипения 40-70°C ("Реахим", Россия). N,N-Диметилформамид (хч, "Реахим") очищали, как указано в [9], и хранили над свежепрокаленными молекулярными ситами 0,4 нм.

Синтез пептидов: Пептиды в виде амидов (далее – пептиды) синтезировали твердофазным методом в ручном варианте путем наращивания цепи с C-конца на полиэтиленовых иглах типа D-series Lantern Rink-amide емкостью 8 мкмоль фирмы Mimotopes (Австралия) [10]. Для защиты боковой группы остатков Ser и Thr использовали трет-бутильную группу, His - тритильную группу, Arg - 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонильную группу, L-, D-, iso-Asp – трет-бутокси-группу. Присоединение производных Fmoc-аминокислот к растущей пептидной цепи проводили карбодиимидным методом при следующих условиях: концентрации Fmoc-аминокислоты – 120 мкМ, DIPC – 120 мкМ, HOBT – 132 мкМ в DMF, 4 или 14 ч при 40°C. Полноту ацилирования Fmoc-аминокислоты контролировали с помощью бромфенолового синего (5 мкл 0,01 М раствора красителя в DMF на 1 мл реакционной смеси). Отщепление пептидов от полимера с одновременным деблокированием боковых функциональных групп проводили в 2 мл смеси TFA-DODT-TIS-анизол-вода в объемном соотношении 183:5:2:5:5 в течение 4 часов [11]. Полученный раствор упаривали на роторном испарителе, остаток суспендировали в 4 мл смеси эфир-петролейный эфир (1:2 по объему). Суспензию охлаждали 30 мин при -20°C и затем центрифугировали.

Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в 2 мл смеси эфир-петролейный эфир, охлаждали и центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок растворяли в 1 мл смеси уксусная кислота-ацетонитрил-вода в объёмном соотношении 1:8:11. Раствор упаривали на ротаторном испарителе. Осадок высушивали в вакуум-эксикаторе над КОН в течение 2 суток.

Удаление Fmoc- групп с растущей пептидной цепи: Для удаления Fmoc-групп использовали следующие реагенты: 1) 20% (здесь и далее – объёмные концентрации, если не оговорено особо) PIP в DMF; 2) 20% PIP+ 2% DBU в DMF; 3) 50% морфолин в DMF; 4) 6% (по весу) пиперазин в DMF; 5) 20% 4MPIP в DMF; 6) 20% 4MPIP + 2% DBU в DMF; 7) 20% PYR в DMF; 8) 20% PYR + 2% DBU в DMF.

Время инкубации 20 минут. При депротекции α -аминогруппы L-, D-, изо-аспарагиновых кислот растворы 2, 6 и 8 заменяли на 1, 5 и 7, соответственно.

Анализ продуктов пептидного синтеза: Окончательной очистке подвергали только малую часть полученных препаратов, поэтому расчет абсолютного выхода очищенных пептидов, а также определение их оптической чистоты путем измерения угла вращения плоскости поляризации света не проводили.

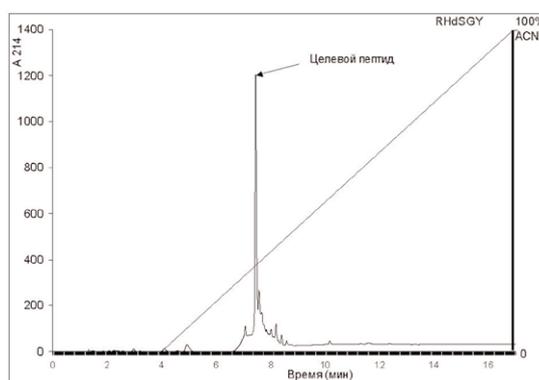
Аналитическую обращённо-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили на приборе Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, США), колонка SB-C18 80A (150 x 4,6 мм) (Agilent Technologies). Элюенты: буфер А - 0,05% TFA в воде, буфер В - 0,05% TFA в ацетонитриле; от 0 до 4 мин - буфер А, от 4 мин до 18 мин - градиент В в А от 0 до 100%, скорость элюции 0,5 мл/мин, поглощение элюата регистрировали при длине волны 214 нм. Образец наносили в объеме 20 мкл.

Масс-спектрометрический анализ продуктов синтеза проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии с ионным источником лазерной десорбции/ионизации из матрицы (MALDI-TOF) на масс-спектрометре Microflex и методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI) на масс-спектрометре Esquire (оба - Bruker Daltonics, Германия). В качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту. Регистрировали спектры положительно заряженных молекулярных ионов в диапазоне масс 500-3000 Да.

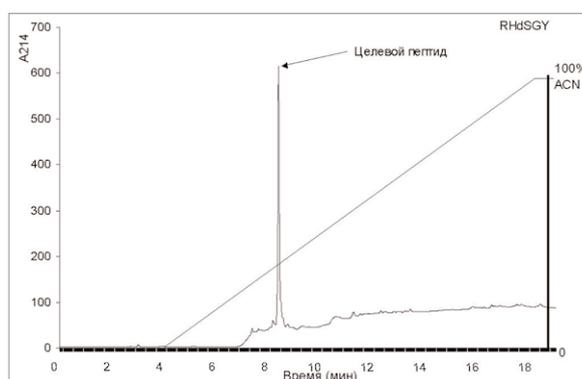
Присутствие в пептидах остатка iso-Asp определяли с помощью масс-спектрометрии ион-циклотронного резонанса по методу [12] на масс-спектрометре с Фурье-преобразователем Apex-Qe FTMS фирмы Bruker Daltonics по появлению в масс-спектре сигнала, соответствующего продукту расщепления Arg-His+H⁺ (масса иона 311,19).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Синтез фрагмента β -амилоида 5RHDSGY10 и его оптического изомера RHdSGY и RHiso-DSGY в виде С-амидированных пептидов был проведен в мини-масштабе на полиэтиленовых иглах с головками сложной геометрической формы (“китайский фонарик”) с поверхностью, модифицированной остатками 4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)-феноксиметила (Fmoc-Rink amide). Каждый синтез проводили на одной игле. В ходе синтеза в стандартных условиях при использовании для удаления Fmoc-групп с растущей пептидной цепи 20%-ного раствора пиперидина [10] пептиды RHdSGY и RHiso-DSGY были получены в виде препаратов, загрязненных примесями, по данным ВЭЖХ (рис. 1) и анализа с помощью MALDI-TOF и ESI масс-спектрометрии - в основном амидами RHdSG и RHiso-DSG (m/e однозарядного иона 567,99) и более короткими пептидами. В препарате RHiso-DSGY присутствовал продукт побочной реакции – пептид с аспартимидом вместо остатка β -Asp (m/e однозарядного иона в MALDI-TOF масс-спектре 715,33, расчетная m/e 715,734); кроме того, остаток iso-Asp в значительной степени эпитермизовался в L- α -Asp. Это было доказано путём анализа препарата пептида методом ион-циклотронной масс-спектрометрии по исчезновению в спектре сигнала, соответствующего иону (Arg-His+H⁺) с массой 311,19, который образуется при ионизационном распаде пептида с β -Asp, но не с L- α -Asp [12].

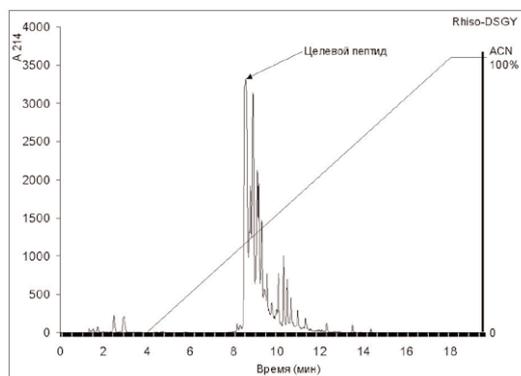
СИНТЕЗ ФРАГМЕНТА β -АМИЛОИДА



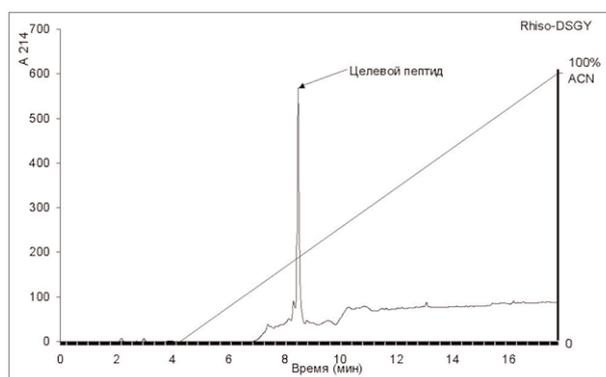
А



Б



В



Г

Рисунок 1.

ВЭЖХ (колонка Agilent Technologies SB-C18 80 A (150×4,6 мм), градиент В в А от 0 до 100% (по объёму) за 14 мин) сырого продукта - 5 RHdSGY¹⁰ (а, б) 5 RHiso-DSGY¹⁰ (в, г), синтезированного с использованием смеси 20% (по объёму) PIP в DMF для удаления Fmoc-группы.

С целью подбора условий, которые бы привели к получению препаратов указанных пептидов более высокой степени чистоты, особенно учитывая то, что пептиды RHiso-DSGY и RHDSGY имеют одинаковые времена удержания при ВЭЖХ (см. рис. 1 и 2) и разделение их представляет крайне сложную задачу, были проведены синтезы пептидов RHiso-DSGY и RHdSGY с использованием в качестве реагентов для удаления Fmoc-группы пиперазина и морфолина. Тестировали также влияние добавки 2% DBU (более сильного основания, применяемого обычно для удаления Fmoc-групп при синтезе пептидов с “трудными” последовательностями [13, 14]) к 20%-ному PIP в DMF на содержание целевого продукта в неочищенном препарате. Однако, как видно из таблицы, добавление 2% DBU к 20%-ному PIP практически не влияет на содержание целевого продукта в препаратах, синтезированных как RHdSGY, так и RHiso-DSGY. В случае синтеза RHdSGY применение пиперазина и морфолина для удаления Fmoc-групп уменьшает выход целевого пептида за счет увеличения относительного содержания примесного укороченного пептида RHdSG (по данным ВЭЖХ и масс-спектрометрии; результаты не приводятся). При синтезе пептида RHiso-DSGY с использованием морфолина, пиперазина или 2%-ного раствора DBU в 20%-ном PIP в DMF для удаления Fmoc-групп выход гексапептида практически не увеличился (см. табл.), однако более слабые основания пиперазин и морфолин способствовали значительному уменьшению образования аспартимида и последующей эимеризации остатка iso-Asp, что привело к получению препарата целевого пептида более высокой оптической чистоты: в масс-спектре ион-циклотронного резонанса препаратов пептида RHiso-DSGY, полученных с использованием пиперазина либо морфолина, присутствовал сигнал, соответствующий иону (Arg-His+H⁺), с m/e 311,19. Этот же сигнал присутствовал и в спектре препарата RHiso-DSGY, очищенного с помощью ВЭЖХ (рис. 1, г).

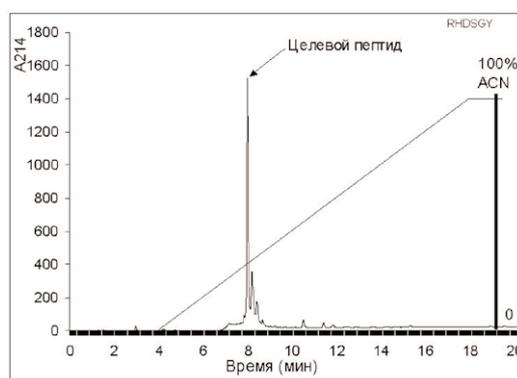
Таблица. Результаты синтеза и характеристика препаратов фрагмента β-амилоида ⁵RHDSGY¹⁰ и его оптических изомеров.

№	Синтезируемый пептид	Реагент для удаления Fmoc-группы*	Выход неочищ. пептида, мг	Эимеризация Asp/iso-Asp	Аспартимид	Содержание целевого продукта в неочищенном препарате, %
1	RHdSGY	20% PIP	5,3	-	<<1%	31
2	RHdSGY	20%PIP+ 2%DBU	7,5	-	<<1%	25
3	RHdSGY	50% морфолин	5,9	-	<<1%	23
4	RHdSGY	6% пиперазин	5,2	-	<<1%	26
5	RHiso-DSGY	20% PIP	6,0	Есть	~2%	20**
6	RHiso-DSGY	20%PIP+2%DBU	5,8	Есть	<1%	21**
7	RHiso-DSGY	50% морфолин	4,0	Нет	<1%	21
8	RHiso-DSGY	6% пиперазин	4,2	Нет	<1%	26
9	RHDSGY	20%PIP+ 2%DBU	6,5	Нет	<1%	27
10	RHDSGY	20% PYR	7,4	Нет	<1%	54
11	RHDSGY	20%PYR+ 2%DBU	6,5	Нет	<1%	48
12	RHDSGY	20% 4MPIP	9,3	Нет	<1%	51
13	RHDSGY	20%4MPIP+2%DBU	9,5	Нет	<1%	65

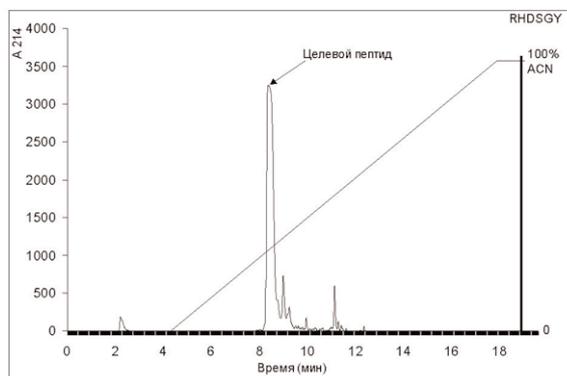
Примечание: *- реагент для удаления Fmoc-группы растворяли в DMF, содержание в % по объёму.
** - суммарное содержание RHiso-DSGY и RHDSGY.

СИНТЕЗ ФРАГМЕНТА β -АМИЛОИДА

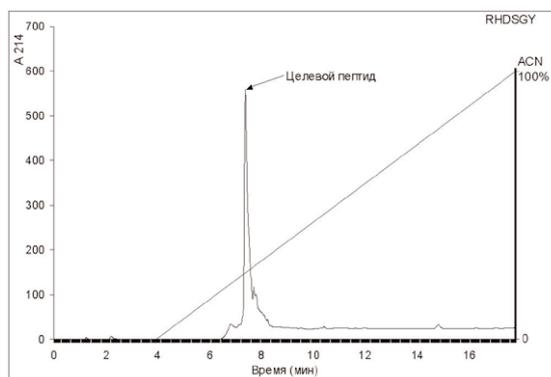
Синтез пептида RHDSGY с использованием в качестве реагента для удаления Fmoc-групп 2%-ного раствора DBU в 20%-ном PIP в DMF привёл к получению препарата с довольно низким относительным содержанием целевого вещества (табл. и рис. 2,а) и наличием примесных укороченных пептидов. При использовании для удаления Fmoc-групп 20%-ного PYR или 20%-ного 4MPIP в DMF, в отсутствие или в присутствии 2% DBU, относительный выход целевого пептида увеличился, в случае 20%-ного 4MPIP с 2% DBU – особенно значительно (табл. и рис. 2, б). В MALDI-TOF и ESI масс-спектрах препаратов RHDSGY, полученных с использованием PYR и 4MPIP и их смесей с DBU, не обнаружены сигналы, соответствующие пептиду RH(Asp-имид)SGY, а также соответственно RH(Asp-пирролидид)SGY (расчётная масса однозарядного иона 786,844) и RH(Asp-4-метилпиперидид)SGY (расчетная масса однозарядного иона 801,874). Масс-спектрометрия ион-циклотронного резонанса показала отсутствие пептида с остатком β -Asp.



A



B



B

Рисунок 2.

ВЭЖХ (колонка Agilent Technologies SB-C18 80 A (150×4,6 мм), градиент В в А от 0 до 100% (по объёму) за 14 мин) сырого продукта-⁵RHDSGY¹⁰, синтезированного с использованием смеси 2% (по объёму) DBU в 20% (по объёму) PIP в DMF (а), 2% (по объёму) DBU 20% (по объёму) 4MPIP в DMF (б, в) для удаления Fmoc-группы.

ОБСУЖДЕНИЕ. Несмотря на небольшой размер фрагмента β -амилоида, 5RHDSGY10 и его оптических изомеров, их синтез представил определенные трудности. Наличие в природном фрагменте пары Asp-Ser было основанием полагать, что в стандартных условиях твердофазного синтеза исходя из Fmoc-аминокислот пиперидин, используемый как катализатор отщепления Fmoc-групп от α -аминогрупп растущей пептидной цепи, будет катализировать и побочную реакцию циклизации остатка Asp с образованием аспартимида [6-8]. Раскрытие же цикла в аспартимиде под действием кислоты или основания может привести к эпимеризации этого остатка с образованием β -Asp. Однако в случае пептида RHDSGY такая побочная реакция если и протекала, то незначительно. Зато в ходе синтеза его изомера (RHiso-DSGY) эта побочная реакция приводила к значительной эпимеризации остатка β -Asp в L-Asp. Лишь при использовании значительно более слабых оснований, пиперазина и морфолина, удалось получить пептид RHiso-DSGY, правда, ценой снижения его выхода за счет неполного отщепления Fmoc-групп от линкера смолы и растущей пептидной цепи. Проблема неполного отщепления Fmoc-групп под действием стандартного реагента 20%-ного раствора PIP в DMF оказалась основной в случае синтеза пептида RHDSGY и не решалась при добавлении более сильного основания DBU. По этой причине, а также потому, что PIP входит в список прекурсоров (список 4) и его приобретение и использование в лабораторной практике затруднены, в твердофазном синтезе пептида RHDSGY были опробованы другие циклические вторичные амины в качестве катализаторов удаления Fmoc групп – PYR и 4MPIP, по основности практически не отличающиеся от PIP (pKa PYR 11,27, PIP – 11,12), в присутствии и в отсутствие 2% DBU. Наилучшие результаты были получены при применении для удаления Fmoc-групп 4MPIP с добавлением 2% DBU. PYR в составе 20%-ного раствора в DMF быстро окислялся, что делало необходимым ежедневное приготовление свежего реагента.

Пептид RHdSGY был получен в виде вполне удовлетворительного по качеству препарата с помощью стандартной методики; D-изомер Asp оказался не склонен к образованию аспартимида и последующей эпимеризации в β -Asp. Хотя синтез этого пептида с использованием 4MPIP и 4MPIP+DBU не проводился, можно полагать, что в этих условиях выход пептида с остатком D-Asp так же, как и пептида с остатком L-Asp, повысится.

Работа поддержана грантами РФФИ № 06-03-33033, № 07-02-01482, 05-03-32870 и Программой РАМН “Протеомика для медицины и биотехнологии”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Clippingdale A.B., Wade J.D., Barrow C.J. (2001) *J. Pept. Sci.*, **7**(5), 227-249.
2. Hardy J., Selkoe D.J. (2002) *Science*, **297**(5580), 353-356.
3. Zirah S., Kozin S.A., Mazur A.K., Blond A., Cheminant M., Segalas-Milazzo I., Debey P., Rebuffat S. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**(4), 2151-2161.
4. Meyer-Luehmann M., Coomaraswamy J., Bolmont T., Kaeser S., Schaefer C., Kilger E., Neuenschwander A., Abramowski D., Frey P., Jaton A.L., Vigouret J.M., Paganetti P., Walsh D.M., Mathews P.M., Ghiso J., Staufenbiel M., Walker L.C., Jucker M. (2006) *Science*, **313**(5794), 1781-1784.
5. Galasko D. (2005) *J. Alzheimers Dis.*, **8**(4), 339-346.
6. Lloyd-Williams P., Albericio F., Giralt E. (1997) in: *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. NY, CRC Press LLC, 280 p.
7. Wade J.D., Mathieu M.N., Macris M., Tregear G.W. (2000) *Letters in Peptide Science*, **7**(2), 107-112(6).
8. Cebrian J., Domingo V., Reig F. (2003) *J. Peptide Res.*, **62**, 238-244.

СИНТЕЗ ФРАГМЕНТА β -АМИЛОИДА

9. Беккер Х., Домике Г., Фангхенель Э. и др. (1992) Органикум (пер. с нем.): В 2-х т. **2**, Мир, М
10. SynPhase Technical Notes (STN) 002-1), <http://www.mimotopes.com>.
11. Teixeira A., Benckhuijsen W.E., de Koning P.E., Valentijn A.R.P.M., Drijfhout J.W. (2002) Protein Pept. Lett., **9**, 379-385.
12. Gonzalez L.J., Shimizu T., Satomi Y., Betancourt L., Besada V., Padron G., Orlando R., Shirasawa T., Shimonishi Y., Takao T. (2000) Rapid Commun. Mass Spectrom., **14**(22), 2092-2102.
13. Hyde C., Johnson T., Owen D., Quibell M., Sheppard R.C. (1994) Int. J. Pept. Protein Res., **43**(5), 431-440.
14. Larsen B.D., Holm A. (1994) Int. J. Pept. Protein Res., **43**(1), 1-9.

Поступила: 05. 07. 2007.

SYNTHESIS OF β -AMYLOID FRAGMENT ⁵RHDSGY¹⁰ AND ITS ISOMERS WITH THE USE OF NEW SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS SCHEDULE

E.Yu. Aleshina, N.V. Pyndyk, A.A. Moisa, M.A. Sanzhakov, O.N. Kharybin, E.N. Nikolaev, E.F. Kolesanova

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: 246-33-75; fax: +7(495)245-08-57;
e-mail: elena.aleshina@ibmc.msk.ru

Peptide RHDSGY that represents the fragment of human β -amyloid Zn-binding site and its isomers RH(D-Asp)SGY and RH(β -Asp)SGY have been prepared by solid-phase synthesis and analysed by HPLC and various mass-spectrometric methods. The problem of low yield of peptide RHDSGY and its isomers attributed to 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-amino acids and/or formation of side-products as RH(Asp-imide)SGY and RHDSGY (instead of RH(β -Asp)SGY) was solved via selection of reagents for the removal of Fmoc groups from the growing peptide chain.

Key words: β -amyloid, solid-phase peptide synthesis, β -Asp, Fmoc-group removal, 4-methyl-piperidine.