

Э. Ю. Ямансаров (к.х.н., зав.лаб.)

СИНТЕЗ ПЕПТИДНОГО ХЕЛАТОРА ИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНОГО СВИНЦА

Башкирский государственный медицинский университет,
лаборатория молекулярных гибридов
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3; e-mail: eyuyamansarov@bashgmu.ru

E. Yu. Yamansarov

SYNTHESIS OF A PEPTIDE CHELATOR OF LEAD (II) IONS

Bashkir State Medical University
3, Lenina Str., 450008, Ufa, Russia; e-mail: eyuyamansarov@bashgmu.ru

Представлена эффективная методика синтеза Pb(II)-специфичного гептапептида методом автоматизированного твердофазного синтеза с применением Fmoc-стратегии на смоле Ринка, включающая максимальную защиту боковых цепей аминокислотных остатков, применение смеси реагентов с подавлением процесса рацемизации для активации карбоксильной функции аминокислот и одновременное проведение глобального деблокирования и снятия пептида с полимерной подложки. Полученный гептапептид может быть использован в качестве перспективного хелатора для конструирования предшественников радиофармацевтических препаратов.

Ключевые слова: Fmoc-стратегия; автоматизированный твердофазный пептидный синтез; гептапептид; пептидные хелаторы

Работа выполнена при поддержке программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» Башкирского государственного медицинского университета.

Благодарю к.х.н., с.н.с. лаборатории физико-химических методов анализа УФИХ УФИЦ РАН М.Ф. Абдуллина за масс-спектрометрический анализ.

Гибридные молекулы и конъюгаты являются неотъемлемой частью современной терапии, диагностики и тераностики социально-значимых заболеваний. Яркими примерами ¹⁻³ являются радиофармацевтические конъюгаты пептидов и белков, конъюгаты антитело-лекарственный препарат (ADC), пептид-лекарственный препарат (PDC), конъюгаты низкомолекулярных адресных лигандов и генотерапевтических агентов, гибриды на основе протеолизных таргетных препаратов и др.

Дата поступления 25.01.26

An efficient method for synthesizing a Pb(II)-specific heptapeptide by automated solid-phase synthesis using the Fmoc strategy on Rink resin is presented. This method includes maximum protection of amino acid side chains, the use of a reagent mixture with suppressed racemization to activate the carboxyl function of amino acids, and simultaneous global deprotection and removal of the peptide from the polymer support. The resulting heptapeptide can be used as a promising chelator for constructing radiopharmaceutical products.

Key words: automated solid-phase peptide synthesis; Fmoc strategy; heptapeptide; peptide chelators

This work was supported by the Priority 2030 strategic academic leadership program of the Bashkir State Medical University.

I thank M.F. Abdullin – Senior Researcher of the Laboratory of Physicochemical Methods of Analysis of the Ufa Federal Research Center of the RAS for the mass spectrometric analysis.

Существенный прогресс в данном направлении связан с развитием ядерной медицины и применением радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП) ⁴. Разрабатываются новые способы получения радиоизотопов фармацевтически-значимых металлов. В результате для создания РФЛП доступен целый ряд разнообразных по своим свойствам радиоизотопов, среди которых ¹⁷⁷Lu, ¹⁶¹Tb, ²²⁵Ac, ⁶⁷Cu, ²¹²Pb, и др.

Как правило, для доставки радиоактивного изотопа используются радиобиоконъюгаты, со-

стоящие из самого радиоизотопа, его хелатора, линкера и адресного вектора³. При помощи последовательного выполнения химических реакций органического синтеза и комплексообразования получают разнообразные гибридные соединения таргетного действия, направленные, например, на простат-специфический мембранный антиген (PSMA), соматостатиновый рецептор (SSTR), рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2), и др.⁵. Среди таргетных векторов значительную группу составляют таргетные белки и другие биомолекулы (моноклональные антитела, пептиды, аптамеры, лиганды углеводной природы, и др.), которые могут быть использованы для адресной доставки токсических агентов в опухолевые клетки, в т.ч. в метастазы^{6,7}. В качестве хелаторов⁸, как правило, используют малые органические соединения – макроциклические производные на основе циклена (например, DOTA), ациклические производные ЭДТА или родственные им соединения, и др. Несмотря на преимущества, для хелатирования радиоизотопов подобными соединениями требуется повышение скорости реакции комплексообразования и жесткие условия высоких температур, что несовместимо или сильно затруднено для применения с белками или белковыми каркасами, которые составляют значительную часть адресных векторов.

К числу наиболее перспективных радиоизотопов в создании РФЛП относят ²¹²Pb благодаря его характеристикам для таргетной альфа-терапии⁸. Изначально изотоп относится к числу β -излучателей, однако он является одновременно и *in vivo* генератором дочернего изотопа ²¹²Bi, который в свою очередь испускает высокоэнергетические α -частицы. В связи с этим поиск и разработка новых соединений, способных эффективно хелатировать ионы свинца, является актуальной задачей.

Пептиды относятся к числу соединений, образующих комплексы с ионами свинца (II). Данное свойство является для этого класса органических веществ нативным и используется в природных объектах как одна из базовых функций для пептидных и белковых молекул. Опубликовано большое число работ, рассматривающих процесс комплексообразования между аминокислотами, пептидами, белками и Pb(II). Например, в работе⁹ была разработана методика подбора с помощью технологии фагового дисплея и найдена последовательность Pb(II)-специфичного пептида (KASPYIT), показана его практическая значимость в колориметрическом анализе. Целью настоящей работы является синтез семимерного олигопептида KASPYIT с помощью метода автоматизированного твердофазного синтеза.

Для достижения поставленной цели нами была разработана методика получения гептапептида *L*-лизил-*L*-аланил-*L*-серил-*L*-пролил-*L*-тирозил-*L*-изолейцил-*L*-треонин-карбоксамида **7** (H-Lys-Ala-Ser-Pro-Tyr-Ile-Thr-NH₂) с помощью Fmoc-стратегии пептидного синтеза на твердой фазе в соответствии с представленной синтетической схемой (схема 1). При этом была предпринята тактика максимальной защиты боковых функциональных групп цепей аминокислотных остатков (*трет*-бутильная защита гидроксильных групп, Вос-защита аминогруппы лизина). Гептапептид **7** получали наращиванием цепи, начиная с С-конца, используя в качестве твердой подложки смолу Ринка. Имобилизацию первого аминокислотного остатка проводили, первоначально выдержав навеску смолы (0.3 г) последовательно в дихлорметане и диметилформамиде.

L-Треонин вводили в реакцию в виде защищенного производного Fmoc-Thr(tBu)-ОН и конденсировали с NH₂-группой смолы **2**, с которой предварительно была удалена Fmoc-защита. Для активации карбоксильной функции аминокислот использовали 2-(1Н-Бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат (HBTU) в присутствии основания – диизопропилэтиламина (ДИПЭА) с образованием оксibenзотриазолильных активированных эфиров аминокислот¹⁰. С целью подавления побочного процесса рацемизации добавляли в реакционную смесь 1-гидроксибензотриазол (HOBt). Для снятия Fmoc-защиты с полимерного носителя и N-концевых аминокислотных остатков в процессе синтеза применили смесь сильного ненуклеофильного основания 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ена (ДБУ) и вторичного циклического алифатического амина 4-метилпиперидина. Согласно литературным данным, применение такой смеси позволяет с повышенной эффективностью и скоростью реакции снимать Fmoc-защиту с аминокислотных аминогрупп в составе пептидов, не содержащих остатки аспарагиновой кислоты¹¹. Снятие целевого пептида с твердой подложки проводили одновременно с глобальным деблокированием при помощи обработки пептидил-полимера **6** смесью реагентов на основе концентрированной трифторуксусной кислоты. Для предотвращения образования побочных продуктов при снятии/деблокировании в коктейль реагентов добавляли триизопропилсилан, этандитиол-1,2, воду.

Последующее переосаждение реакционной смеси привело к образованию 111 мг продукта **7**. Очистку гептапептида KASPYIT **7** осуществили с использованием метода обращенно-фазовой хроматографии и выделили 52.2 мг, выход составил 45.7%. Образование целевого соединения под-

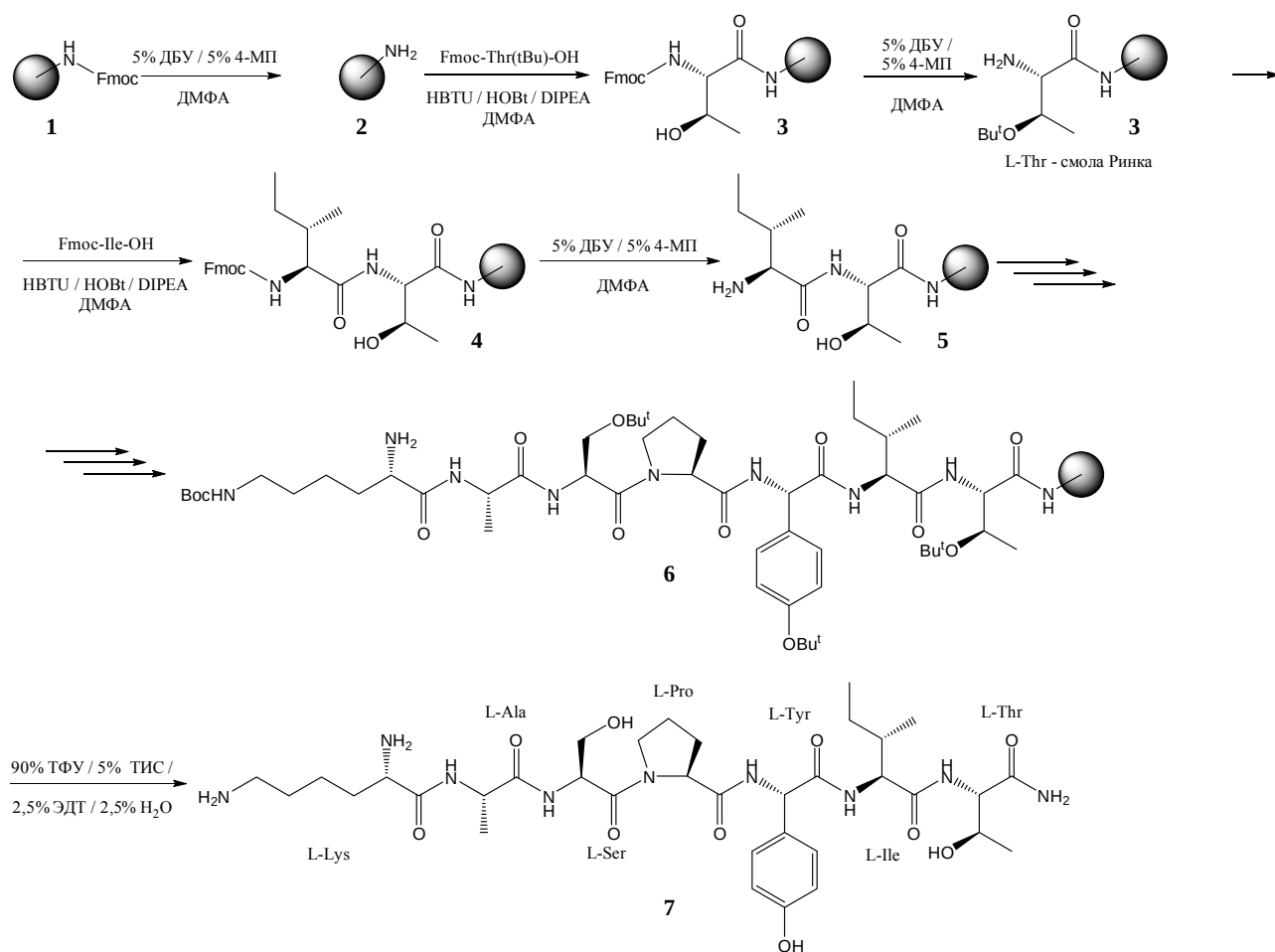


Схема 1

твердили на основании данных масс-спектрометрии ESI MS.

Таким образом, была разработана эффективная методика автоматизированного синтеза и получен гептапептид KASPYIT – перспективный пептидный хелатор ионов свинца (II). В последующем полученное соединение будет использовано в создании предшественников радиофармацевтических лекарственных препаратов.

Экспериментальная часть

Все растворители – коммерчески доступные продукты (Экос-1 и Акватрия, Россия). В работе использовали производные аминокислот (Shanghai Macklin Biochemical Co., Ltd, Китай), концентрированную трифторуксусную кислоту (Кемикал Лайн, Россия). Очищенную воду получали на установке Аквалаб S18 (АкваЛаб, Россия).

Масс-спектры низкого разрешения получены с использованием моноквадрупольного жидкостного хроматомасс-спектрометра Shimadzu LCMS-2010EV в условиях ионизации электрораспылением (ИЭР) в режиме регистрации положительных ионов при потенциале капилляра 4.5 кВ,

диапазон измеряемых масс 10–2000 а.е.м., температура испарителя 230 °С, температура нагревателя 200 °С, элюент ацетонитрил-вода (1:1), скорость потока 0.25 мл/мин, скорость распыляющего газа (азот) 1.5 л/мин. Образец растворяли в смеси ацетонитрила и воды, пробу образца 2.5 мкл вводили в инжектор с помощью микрошприца вручную.

Аналитическую ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа LicArt 62 (Лабконцепт, Россия), оборудованного насосом модели QP-62d и детектором DAD-62, на колонке Inspire (Dikma Technologies, Корея) Ultisil C18 (4.6×150 мм, 5 мкм) с детекцией на трех длинах волн (214, 254 и 280 нм). Объемный расход элюента 0.75 мл/мин. Элюент А – вода (0.1%-ная TFA), элюент В – ацетонитрил (0.1%-ная TFA). Параметры градиента: 0-3 мин – 5% В; 3-25 мин – 5–100% В; 25-27 мин – 100% В; 27-28 мин – 100–5% В; 28-30 мин – 5% В.

Препаративное хроматографическое разделение проводили с использованием системы Sepsa machine T (Santai Technologies, Канада).

Условия синтеза пептида. Синтез проводили на установке автоматизированного микроволнового пептидного синтеза Biotage Initiator + Alstra

(Швеция) с использованием полимерного амидного АМ-носителя Ринка с загрузкой аминогрупп 0,5 ммоль/г (0.15 ммоль) и защищенных производных аминокислот: Fmoc-L-Lys(Boc)-ОН, Fmoc-L-Ala-ОН, Fmoc-L-Ser(t-Bu)-ОН, Fmoc-L-Pro-ОН, Fmoc-L-Tyr(t-Bu)-ОН, Fmoc-L-Ile-ОН, Fmoc-L-Thr(t-Bu)-ОН. Операции промывок и деблокирования временной N α -Fmoc-защитной группы проводили по известным методикам, а активацию производных аминокислот – с помощью HBTU/НОВt/DIPEA. Предварительно носитель подвергали набуханию в ДМФА при 70 °С в течение 20 мин и дважды обрабатывали смесью 5% ДБУ/5% 4-метилпиперидина в ДМФА в течение 3 и 30 мин. Затем смолу подвергали обработке растворами защищенных аминокислот (5 экв.), HBTU (5 экв.), NOVt (5 экв.) и DIPEA (6 экв.) в ДМФА. Первый остаток Fmoc-L-Thr(t-Bu)-ОН конденсировали при комнатной температуре в течение 180 мин. Введение последующих остатков при наращивании цепи проводили при 60 °С в течение 20 мин. Для снятия Fmoc-защит использовали стандартные условия двойной обработки пептидил-полимера смесью 5% ДБУ/5% 4-метилпиперидина в ДМФА в течение 3 и 25 мин. После снятия Fmoc-защиты с терминальной аминокислоты смолу промывали дихлорметаном (30 мл).

Общие условия осуществления стадии глобального деблокирования и снятия пептида с подложки. Пептидил-полимер (0.15 ммоль) суспендировали в смеси трифторуксусной кислоты (4.0 мл), триизопропилсилана (0.5 мл), воды (0.25 мл) и

этандитиола-1,2 (0.25 мл) в плотно закрытом полипропиленовом шприце. Суспензию перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре, после чего фильтровали на фильтре. Пептидил-полимер промывали трифторуксусной кислотой (2 × 1 мл), полученные фильтраты объединяли. Объединенный фильтрат переосаждали в 50 мл холодного метил-трет-бутилового эфира и фильтровали. Выпавший белый хлопьевидный осадок центрифугировали на центрифуге Gyrozen 416 (4000 об./мин, 10 мин), осадок отделяли от раствора декантированием. Далее осадок промывали метил-трет-бутиловым эфиром (2 × 50 мл). Полученное соединение сушили в вакуум-эксикаторе над P₂O₅ в течение 24 ч. Масса смеси после высушивания составила 0.111 г (96.5%).

Флеш-хроматография. Хроматографическое разделение проводили на картридже SepaFlash SW-5223-012-SP(AQ) (15 мкм, 30 × 120 мм). Пептид растворяли в 1 мл воды (0.1%-ная ТФУ). Элюент А – вода (0.1%-ная ТФУ), элюент В – ацетонитрил (0.1%-ная ТФУ). Объемный расход элюента 15 мл/мин, объем фракции 10 мл. Параметры градиента: 0-2 мин – 0% В; 2-12 мин – 0-10% В; 12-17 мин – 10-70% В; 17-22 мин – 100% В. Выделенную фракцию упаривали на центрифужном концентраторе при 30 °С, замораживали при минус 80 °С и лиофилизировали в течение 24 ч.

H-Lys-Ala-Ser-Pro-Tyr-Ile-Thr-NH₂. Выход 52.2 мг (45.7%). Время удерживания 9.18 мин. T_{ml} = 135–137 °С. ESI MS m/z : найдено М 778.7; вычислено для C₃₆H₆₀N₉O₁₀⁺, [M+H]⁺ 778.5.

Литература

1. Blanco M.J., Gardinier K.M. New chemical modalities and strategic thinking in early drug discovery // *ACS medicinal chemistry letters*.– 2020.– V.11, №3.– Pp.228-231.
2. Valeur E., Gueret S.M., Adihou H., Gopalakrishnan R., Lemurell M., Waldmann H., Grossmann T.N., Plowright A.T. New modalities for challenging targets in drug discovery // *Angewandte Chemie International Edition*.– 2017.– V.56, №35.– Pp.10294-10323.
3. Ma M.T., Lewis J.S. State-of-the-Art of Radiometal-based Bioconjugates for Molecular Imaging and Radiotherapy // *Bioconjugate Chemistry*.– 2021.– V.32, №7.– Pp.1175-1176.
4. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. Targeted nuclear medicine. Seek and destroy // *Russian Chemical Reviews*.– 2022.– V.91, №3.– P.RCR5034.
5. Hoppenz P., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A.G. Peptide-drug conjugates and their targets in advanced cancer therapies // *Frontiers in chemistry*.– 2020.– V.8.– P.571.
6. Vadevoo S.M.P., Gurung S., Lee H.S., Gunasekaran G.R., Lee S.M., Yoon J.W., Lee Y.K., Lee B. Peptides as multifunctional players in cancer therapy // *Experimental & molecular medicine*.– 2023.– V.55, №6.– Pp.1099-1109.

References

1. Blanco M.J., Gardinier K.M. [New chemical modalities and strategic thinking in early drug discovery]. *ACS medicinal chemistry letters*, 2020, vol.11, no.3, pp.228-231.
2. Valeur E., Gueret S.M., Adihou H., Gopalakrishnan R., Lemurell M., Waldmann H., Grossmann T.N., Plowright A.T. [New modalities for challenging targets in drug discovery]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, vol.56, no.35, pp.10294-10323.
3. Ma M.T., Lewis J.S. [State-of-the-Art of Radiometal-based Bioconjugates for Molecular Imaging and Radiotherapy]. *Bioconjugate Chemistry*, 2021, vol.32, no.7, pp.1175-1176.
4. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. [Targeted nuclear medicine. Seek and destroy]. *Russian Chemical Reviews*, 2022, vol.91, no.3, p.RCR5034.
5. Hoppenz P., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A.G. [Peptide-drug conjugates and their targets in advanced cancer therapies]. *Frontiers in chemistry*, 2020, vol.8, p.571.
6. Vadevoo S.M.P., Gurung S., Lee H.S., Gunasekaran G.R., Lee S.M., Yoon J.W., Lee Y.K., Lee B. [Peptides as multifunctional players in cancer therapy]. *Experimental & molecular medicine*, 2023, vol.55, no.6, pp.1099-1109.

7. Paul S., Konig M.F., Pardoll D.M., Bettegowda C., Papadopoulos N., Wright K.M., Gabelli S.B., Ho M., van Elsas A., Zhou S. Cancer therapy with antibodies // *Nature Reviews Cancer*.– 2024.– V.24, №6.– Pp.399-426.
8. Kokov K.V., Egorova B.V., German M.N., Klabukov I.D., Krashennnikov M.E., Larkin-Kondrov A.A., Makoveeva K.A., Ovchinnikov M.V., Sidorova M.V., Chuvilin D.Y. 212Pb: production approaches and targeted therapy applications // *Pharmaceutics*.– 2022.– V.14, №1.– P.189.
9. Korkmaz N., Kim M. Phage display selection of a Pb (II) specific peptide and its application as a biorecognition unit for colorimetric detection of Pb (II) ions // *Biotechnology Journal*.– 2024.– V.19, №1.– P.2300482.
10. Tofteng A.P., Pedersen S.L., Staerk D., Jensen K.J. Effect of residual water and microwave heating on the half-life of the reagents and reactive intermediates in peptide synthesis // *Chemistry-A European Journal*.– 2012.– V.18, №29.– Pp.9024-9031.
11. Ralhan K., KrishnaKumar V.G., Gupta S. Piperazine and DBU: a safer alternative for rapid and efficient Fmoc deprotection in solid phase peptide synthesis // *RSC Advances*.– 2015.– V.5, №126.– Pp.104417-104425.
7. Paul S., Konig M.F., Pardoll D.M., Bettegowda C., Papadopoulos N., Wright K.M., Gabelli S.B., Ho M., van Elsas A., Zhou S. [Cancer therapy with antibodies]. *Nature Reviews Cancer*, 2024, vol.24, no.6, pp.399-426.
8. Kokov K.V., Egorova B.V., German M.N., Klabukov I.D., Krashennnikov M.E., Larkin-Kondrov A.A., Makoveeva K.A., Ovchinnikov M.V., Sidorova M.V., Chuvilin D.Y. [212Pb: production approaches and targeted therapy applications]. *Pharmaceutics*, 2022, vol.14, no.1, p.189.
9. Korkmaz N., Kim M. [Phage display selection of a Pb (II) specific peptide and its application as a biorecognition unit for colorimetric detection of Pb (II) ions]. *Biotechnology Journal*, 2024, vol.19, no.1, p.2300482.
10. Tofteng A.P., Pedersen S.L., Staerk D., Jensen K.J. [Effect of residual water and microwave heating on the half-life of the reagents and reactive intermediates in peptide synthesis]. *Chemistry-A European Journal*, 2012, vol.18, no.29, pp.9024-9031.
11. Ralhan K., KrishnaKumar V.G., Gupta S. [Piperazine and DBU: a safer alternative for rapid and efficient Fmoc deprotection in solid phase peptide synthesis]. *RSC Advances*, 2015, vol.5, no.126, pp.104417-104425.