

# ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И ИНСТРУМЕНТЫ

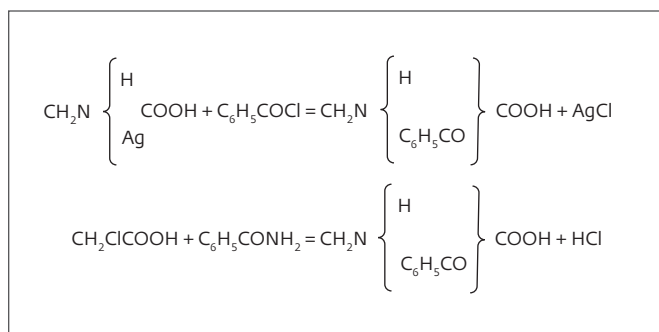
**Дубинин Е.В.**, к.б.н., **Чазов А.И.**, к.ф.-м.н., ООО "ЭЛЕМЕНТ", info@element-msc.ru;  
**Липеева А.В.**, к.х.н., ООО "ЛабПро Медиа"

Одно из важных применений синтетических пептидов в биологии заключается в их использовании в качестве иммуногенов для получения антипептидных антител, способных связываться с родственным родительским белком. Такие антитела являются объектами для анализа антигенной структуры и выбора целевых сайтов связывания для функциональных исследований. Помимо этого, синтетические пептиды активно изучаются в качестве вакцин против вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний. Такие работы требуют наличия пептидов в больших количествах и с очень высокой чистотой. Основными методами получения пептидов являются химический синтез, выделение из природных источников, рекомбинантные методы, используемые при биохимической экспрессии белков, или комбинация этих подходов. Выбор подходящего оборудования для проведения синтеза и очистки этих соединений играет важнейшую роль.

Первый пример пептидного синтеза относится к 1882 году, когда Теодор Курциус опубликовал статью "О некоторых новых, синтетически полученных амидокислотах, аналогичных гиппуровой кислоте", в которой была описана методика получения бензоилглицилглицина, первого N-защитненного дипептида, с использованием серебряной соли глицина и бензоилхлорида [1] (рис.1).

Термин "пептид" был впервые введен в обращение Эмилем Фишером в 1902 году после его совместной работы с Эрнестом Фурно, результатом которой, помимо синтеза глицилглицина, первого свободного дипептида, стало описание примеров получения более длинных пептидных цепочек из остатков гликоля и мочевины [2]. Так впервые были синтезированы этиловый эфир глицилглицина, фенолцианат-глицилглицин, карбатокил-глицилглицин, карбамидо-глицилглициновый эфир.

Первые методы синтеза пептидов работали по следующей схеме: в аминогруппу аминокислоты вводили

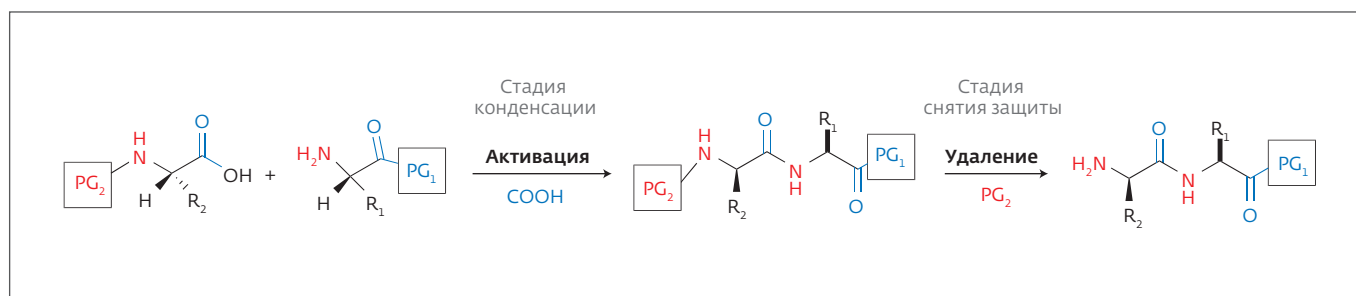


**Рис.1.** Первый пример пептидного синтеза Т.Курциуса

защитную группу R во избежание побочных реакций, затем карбоксильную группу модифицировали таким образом, чтобы она могла связываться со второй аминокислотой, и после образования пептида защитная группа R снова отщеплялась. Главной трудностью был поиск подходящей защитной группы, способной к легкому отщеплению без какого-либо влияния на пептидную связь. На тот момент в качестве R использовали ацетил- или толуолсульфонил, но их применение в синтезе пептидов сопровождалось низкими выходами и большим количеством побочных продуктов. Революцию в пептидном синтезе произвела статья Макса Бергманна 1932 года [3], в которой впервые было описано использование защитной группы уретанового типа - карбобензоксигруппы (Cbz или Z-группа), которая легко удаляется каталитическим гидрированием, ацидолизом с HBr либо восстановлением натрием в жидком аммиаке, не затрагивая при этом образующуюся пептидную связь.

К 1950 году пептидный синтез стал отработанной процедурой, практически с количественными выходами были получены разнообразные пептиды, в том числе аналогичные природным (синтез окситоцина [4]). В 1957 году в качестве защитной группы впервые использовали третбутилоксикарбонильную (Boc) [5], устойчивую к сильным щелочам, восстановлению натрием и каталитическому гидрированию и удобную для применения в комбинации с Z-защитной группой.

Сегодня существуют два подхода к синтезу пептидов, различающихся в природе защитной группы карбоксильной группы первой аминокислоты. Если она растворима



**Рис.2.** Общая схема пептидного синтеза, PG1 и PG2 – защитные группы аминокислот

в реакционной среде, синтез считается жидкофазным, а если представляет собой нерастворимую смолу – твердофазным. Но в обоих случаях образование пептидной связи достигается сочетанием двух аминокислотных остатков: один защищен на С-конце, а другой – на N-конце (рис.2).

Главным недостатком жидкофазного пептидного синтеза считается невысокая скорость реакции и необходимость очистки и выделения продукта после каждой стадии, что приводит к потерям целевого пептида, увеличению общего времени синтеза и сложностям масштабирования и автоматизации процесса. Эти проблемы отсутствуют при твердофазном способе синтеза.

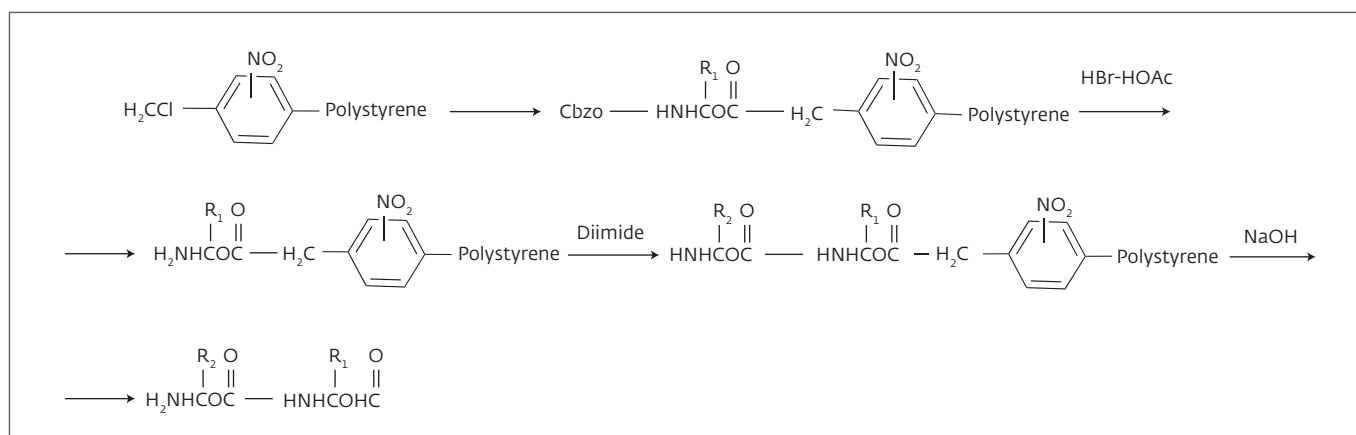
### ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ

Впервые схема твердофазного синтеза пептидов была предложена Брюсом Меррифилдом в 1963 году [6, 7], он продемонстрировал синтез модельного тетрапептида L-лейцил-L-аланилглицил-L-валина, в котором поэтапное добавление защищенных аминокислот осуществлялось к растущей пептидной цепи, ковалентно связанной с твердым полимерным носителем. Далее излишки реагентов и побочные продукты удалялись простой фильтрацией, без перекристаллизации про-

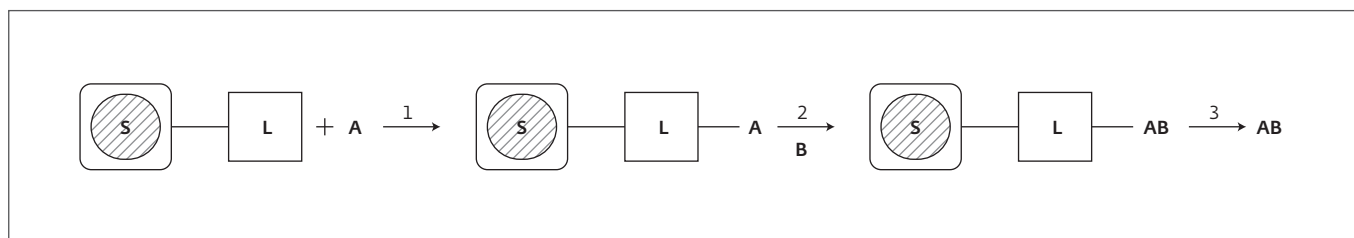
жуточных продуктов (рис.3). Позднее автор показал, что использование Вос-защищенных аминокислот вместо Z-защищенных позволяет применять легкодоступную хлорметилсополистирол-дивинилбензольную смолу и дополнительно сократить время реакции и повысить выход целевых пептидов. За свое открытие в 1984 году исследователь получил Нобелевскую премию за выдающиеся достижения в области химического синтеза на твердой подложке.

Для твердофазного пептидного синтеза (ТФПС) требуется полимерная основа – смола S, к которой прикреплен линкер L. На первой стадии к линкеру присоединяют молекулу субстрата А. Молекула А иммобилизуется, но сохраняет способность реагировать с другим реагентом В (стадия 2) (рис.4).

Продукт АВ остается на смоле, что позволяет отделить его от избытка реагента В (и побочных продуктов) простым промыванием. При этом можно добавлять все новые реагенты, последовательно усложняя исходный субстрат, а главное, чтобы линкер в этих реакциях оставался неизменным. Бифункциональный линкер L подбирается так, чтобы его связь со смолой S была прочнее, чем с субстратом А, так как на последней стадии целевое соединение АВ отделяется от смолы, разрушая его связь с линкером. Связь



**Рис.3.** Оригинальная схема синтеза Б.Меррифилда



**Рис.4.** Общая схема твердофазного синтеза пептидов

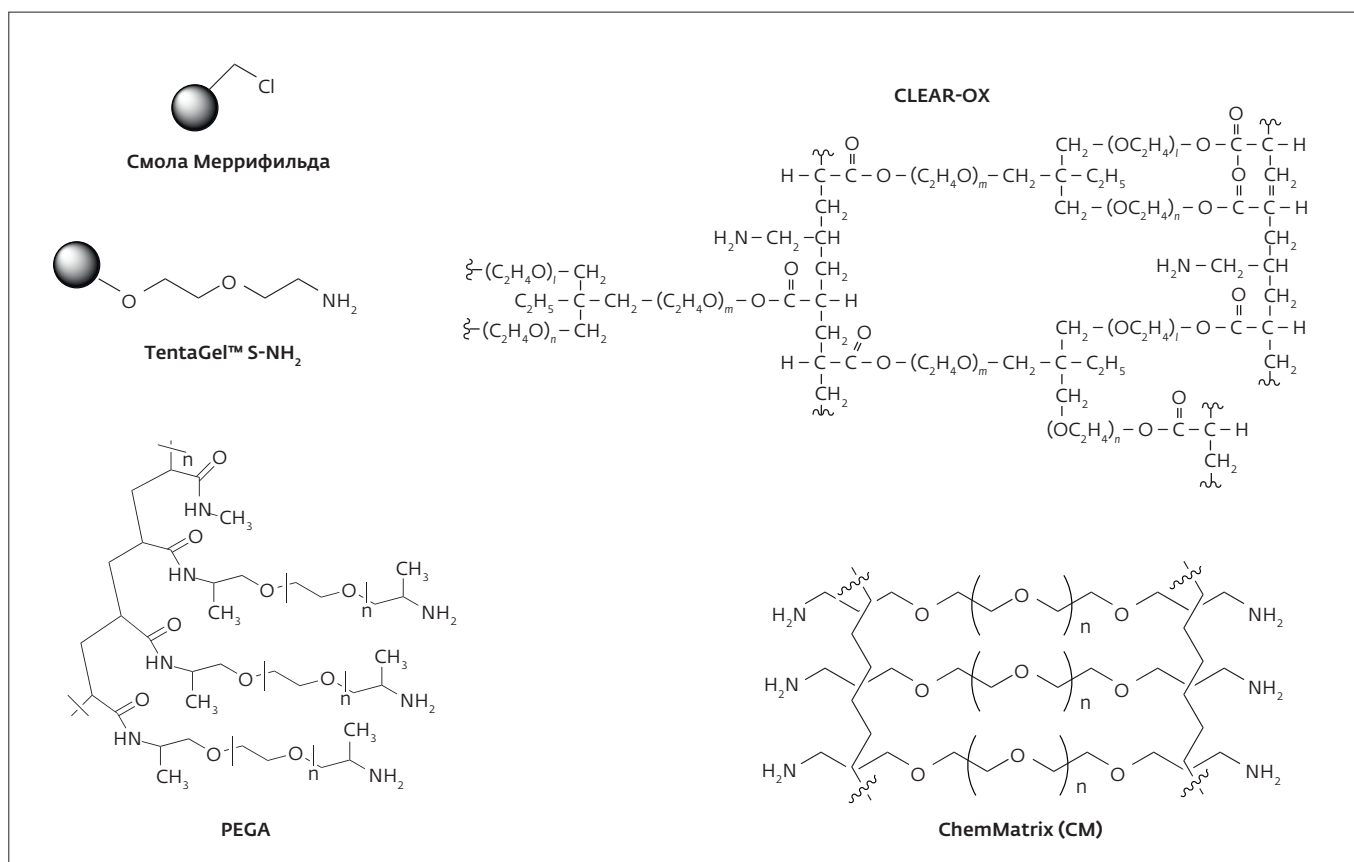
L-AB должна расщепляться в мягких условиях, не повреждая ни само соединение (связь А-В), ни контакт линкера со смолой (связь L-S) [8].

Ключевую роль в ТФПС играет выбор носителя, на который происходит иммобилизация первой аминокислоты. Твердый носитель должен быть устойчив к механическому перемешиванию в широком диапазоне растворителей и температур, а также набухать в широком спектре растворителей, чтобы реагенты могли легко получить доступ к активным участкам. Выбор защитных групп, связующих реагентов и условий расщепления непосредственно связан с выбором полимерного носителя и линкера.

### Виды полимерных носителей

Эффективная сольватация пептида/смолы является наиболее важным условием для эффективной сборки цепи во время ТФПС. Набухшие гранулы смолы могут реагировать и промываться партиями при перемешивании, затем фильтроваться. В качестве альтернативы их можно упаковать в колонки и использовать в режиме непрерывного потока, прокачивая реагенты и растворители через смолу.

В зависимости от функциональной группы полимера существует три типа смол: смолы на основе полистирола (PS) – широко используются в синтезе коротких и средних по длине пептидов; смолы на основе функционализованного полиэтиленгликоля (PS-PEG) и чистые



**Рис.5.** Основные типы твердофазных носителей в пептидном синтезе

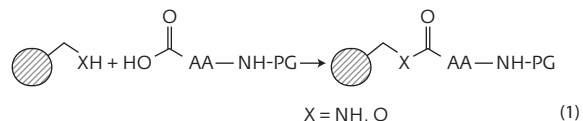
PEG-смолы – используются в синтезе средних и длинных пептидов или пептидов со сложными последовательностями [9, 10].

В случае полистирольной смолы полимер обычно сшивается с 1% дивинилбензола (DVB). Первым и самым доступным твердым носителем этого типа считается хлорметилированный полистирол (сшитый небольшим количеством дивинилбензола), предложенный Б. Меррифилдом, так называемая смола Меррифилда (рис.5). Этот тип полимерного носителя хорошо разбухает в таких растворителях, как дихлорметан (DCM), толуол, N,N-диметилформамид (DMF), диоксан, тетрагидрофур (THF) и N-метил-2-пирролидон (NMP). Однако эта смола несовместима с водой или другими полярными растворителями.

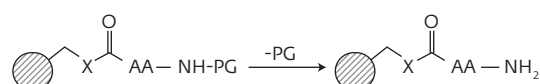
Для синтеза с участием высокогидрофобных аминокислот или сложных пептидных последовательностей лучше подходят более гидрофильные твердые носители второй группы, например тентагель (TG), наиболее хорошо изученная PEG-PS смола, которая применима для синтеза как в полярных, так и в неполярных растворителях. Смолы TG получают путем прививания PEG-цепей (50–70%) к полистиролу малой сшивки с помощью эфирных связей (см. рис.5).

Третья группа полимерных носителей – гидрофильные смолы на основе PEG, которые не содержат полистирола или очень малое его количество. Эта группа включает полимеры, которые очень хорошо набухают в воде. Главными представителями этой категории являются PEGA (бисерный сополимер полиэтиленгликоль–полиакриламид [11]) и CLEAR и CLEAR-OX (сшитые этоксилат-акрилатные смолы) [12]. Смолы PEGA очень чувствительны при сушке, и поэтому они поставляются набухшими в этаноле. Новый тип полимерного носителя под названием ChemMatrix (CM) сочетает в себе преимущества двух предыдущих полимеров, а именно химическую стабильность полистирольных смол и универсальность PEG-привитых смол, что делает его мощным инструментом для синтеза крупных пептидов или сложных последовательностей со многими гидрофобными аминокислотами [13]. Пошаговая твердофазная сборка высокосложного β-амилоидного (1-42) пептида с использованием смолы ChemMatrix позволила получить пептид с чистотой 91%, которая не была достигнута при использовании PS-смол. Большинство вышеперечисленных полимерных носителей продаются с различными линкерами (Rink амидный линкер, Sieber амидный линкер, PAL линкер, Wang HMPA линкер, 2-Хлортритилхлорид), которые обеспечивают ковалентную связь между пептидной цепью и твердым носителем, также линкер играет роль защитной группы для C-концевой карбоксильной

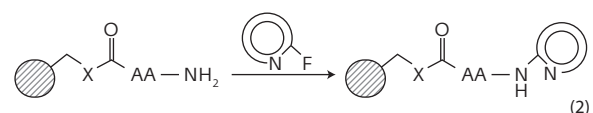
**Стадия 1.** Иммунизация N-защитной аминокислоты на полимерный носитель



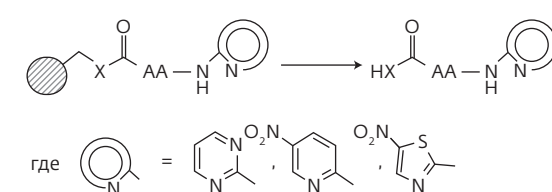
**Стадия 2.** Деблокирование аминокислоты



**Стадия 3.** Нуклеофильное замещение в гетероцикле



**Стадия 4.** Снятие продукта с полимерного носителя



**Рис.6.** Основные стадии ТФСП. AA – фрагмент аминокислоты, PG – защитная группа

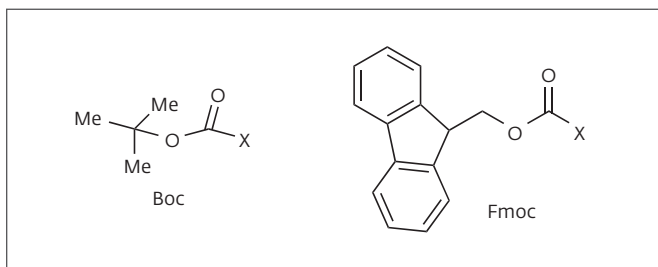
группы. Кроме того, линкер используется для модификации C-конца пептида и определяет оптимальный выбор защитных групп, связывающих реагентов и условий расщепления [14]. Например, линкеры могут подразделяться на низко и высоко кислотно-лабильные, что позволяет при необходимости отщеплять от смолы полностью защищенный пептид для проведения дальнейших модификаций соединения.

### Стадии твердофазного пептидного синтеза

В ТФСП, как и в любом пептидном синтезе, принято выделять 4 основные стадии (рис.6).

Первой стадией ТФСП является иммобилизация аминокислоты на полимерный носитель. Для того чтобы избежать побочного процесса образования олигопептидов, аминокислоту предварительно защищают с помощью групп карбаматного типа – трет-бутилоксикарбонил/бензил (Boc/Bzl) и 9-фторенилметоксикарбонил/трет-бутил (Fmoc/t-Bu) (рис.7).

Аминокислоты можно разделить на три класса в зависимости от необходимости защиты боковой цепи. К первой группе относятся аминокислоты, для которых защита не



**Рис.7.** Защитные группы, X – защищаемая аминокислота

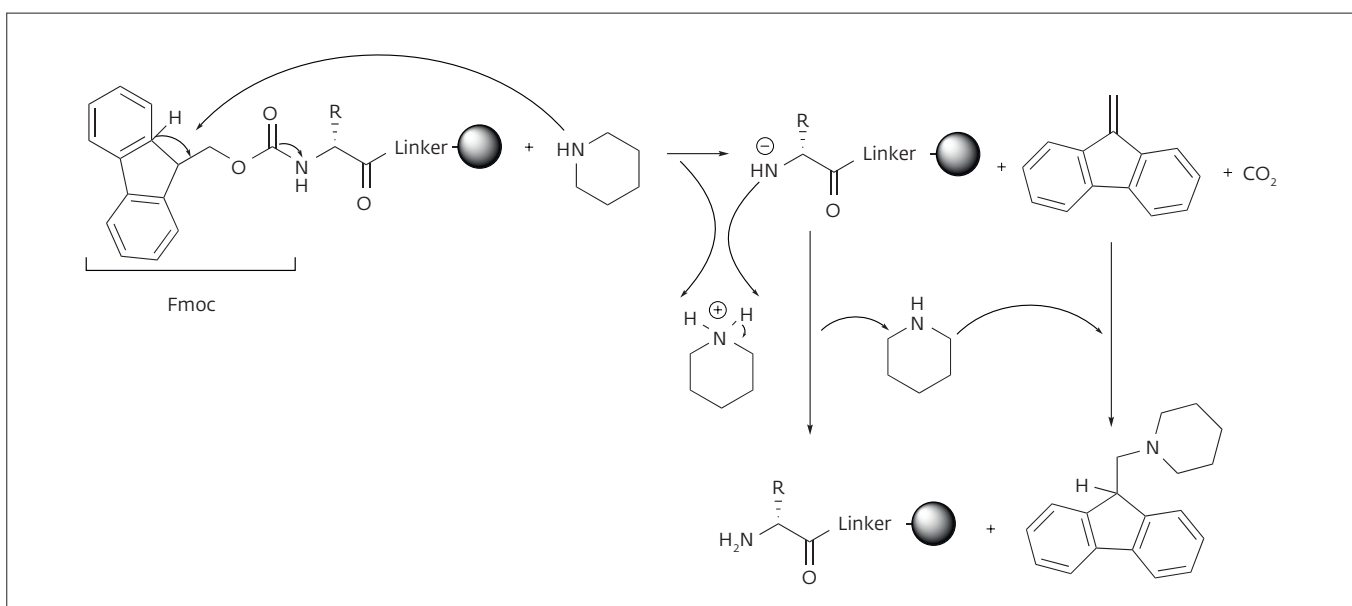
требуется (Ala, Gly, Leu, Ile, Val, Phe, Met и Pro). Защита является необязательной, но рекомендуется для His, Asn, Gln и Trp во избежание возможных проблем, связанных с защищенными боковыми цепями. Для Asp, Glu, Lys, Orn, Arg, Cys, Ser, Thr и Tyr введение защитных групп является обязательным. Защитные группы боковой цепи выбираются так, чтобы они были совместимы с выбранной временной защитной группой. Защита аминокислот в боковой цепи Lys и Orn обычно достигается с использованием Boc для стратегии с использованием Fmoc и 2-хлорбензилоксикарбоната (2-Cl-Z) – с Boc [15, 16].

В целом с синтетической точки зрения механизм участия их в ТФПС во многом схож: в обоих случаях защита боковой цепи основана на эфирах, сложных эфирах, карбаматах, карбоксиамидах и сульфонидамидах, активация карбоксила достигается с помощью одних и тех же активирующих реагентов, а снятие защиты осуществляется в кислой среде. Вследствие некоторых недостатков Boc-защиты (необходимость проводить на каждой стадии синтеза сня-

тие защитной группы, использование на последней стадии фтористоводородной кислоты) в настоящее время чаще стараются использовать защиту Fmoc/t-Bu. Однако и Boc-защита не теряет своей актуальности – наилучшие выходы C-концевых α-карбокситиоэфиров, важных синтонов для общего химического синтеза белков и биоконъюгатов, достигаются именно с помощью химии Boc.

Успех химии Fmoc в биомедицине был обусловлен возможностью быстро приготовить пептиды, пригодные для производства антител, используя недорогое оборудование и без использования HF [17]. Процесс ТФСП в случае Fmoc легко автоматизировать, поскольку в циклах синтеза не требуются сильные кислоты (HF, TFA), а снятие защиты высвобождает флуореновую группу с сильными свойствами поглощения УФ-излучения, что является полезным индикатором успешности синтеза [18]. Мягкие условия снятия защиты Fmoc применимы даже для чувствительных фосфорилированных и гликозилированных пептидов [19].

В случае Fmoc возможно применение ортогональной защиты, когда две функциональные группы могут быть защищены двумя разными защитными группами, а позже в синтезе одна из них может быть выборочно удалена, в то время как другая остается нетронутой, то есть вторая функциональная группа остается защищенной. Стратегия ортогональной защиты позволяет получать большое количество важных синтетических пептидов, включая модифицированные и циклические биоактивные пептиды. Еще одним достоинством использования Fmoc-защиты является возможность нагревания реакционной смеси для увеличения выхода пептида и сокращения времени реакции. Микроволновой нагрев в сочетании с Fmoc успешно



**Рис.8.** Схема удаления защитной группы Fmoc с использованием пиперидина

**Табл.1.** Основные конденсирующие агенты в пептидном синтезе

| Конденсирующий агент                  | Условия конденсации                   |                                       |                              |          |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|----------|
|                                       | Добавка                               | Растворитель                          | Температура, °С              | Время, ч |
| Дициклогексилкарбодиимид (ДЦГК)       | –                                     | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>       | 25                           | 2–4      |
|                                       | –                                     | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> –ДМФА | 25                           | 2–4      |
|                                       | –                                     | ДМФА                                  | 25                           | 2        |
|                                       | –                                     | ТГФ                                   | –20 (до набухания), затем 20 | 12–24    |
| Активированные р-нитрофениловые эфиры | –                                     | ДМФА                                  | 25                           | 8–24     |
|                                       | –                                     | ДМФА                                  | 25                           | 12–24    |
| N-оксисукцинимидные                   | 1,2,4-триазол, N-оксисукцинимид, ДЦГК | ДМФА                                  | 25                           | 8–12     |
| Пентахлорфениловые                    | –                                     | ДМФА                                  | 25                           | 12       |
|                                       | N-метилморфолин                       | ДМФА                                  | 25                           | 20       |
| Трихлорфениловые                      | 1,2,4-триазол                         | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> –ДМФА | 25                           | 20–65    |
| 2-акридиновые                         | –                                     | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>       | 25                           | 12       |
| N-этоксикарбонил-1,2-гидрохинолинол   | –                                     | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>       | 25                           | 2–12     |
| Симметричные ангидриды                | –                                     | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>       | 25                           | 2        |
| N-карбоксиянгидриды                   | –                                     | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>       | 25                           | 1,5      |
|                                       | –                                     | ДМФА                                  | 25                           | 24       |
| Водорастворимый карбодиимид           | –                                     | H <sub>2</sub> O                      | 20                           | 1–24     |

применялся для синтеза последовательностей, склонных к агрегации, таких как полипептид островкового амилоида (IAPP) с 37 остатками и гемагглютинин вируса гриппа [19].

Вторая стадия ТФСП – деблокирование защищенной аминокислоты на полимерном носителе, когда требуется снять защитную группу для активации аминогруппы. Как упоминалось выше, для Вос-защиты это использование безводной HF, Fмос-защита снимается в мягких условиях, чаще всего с использованием пиперидина, что приводит к образованию желаемого свободного аминокон компонента и образованию фульвен-пиперидинового аддукта по реакции между дибензофульвеном и пиперидином (рис.8).

На третьей стадии ТФСП происходит реакция нуклеофильного замещения в гетероциклах с участием иммо-

билизованной на носителе аминокислоты и образование пептидной связи. Это главная стадия пептидного синтеза. Отсутствие в ТФСП стадий промежуточной очистки продукта позволяет получить выход целевого продукта, близкий к количественному. На этой стадии используются различные конденсирующие агенты – наиболее распространенным продолжает оставаться дициклогексилкарбодиимид (ДЦГК) (табл.1). С помощью этого реагента все белковые аминокислоты (кроме аспарагина и глутамина) можно успешно вводить в пептидную цепь, присоединенную к полимеру-носителю. Иногда наблюдаются затруднения при введении в пептидную цепь остатков валина и изолейцина, что связано с их пространственной структурой. Использование смешанных ангидридов с изобутилхлоркарбонатом может при-



**Рис.9.** CSBio – ведущая компания по производству автоматизированных пептидных синтезаторов, с 1993 года поставляет оборудование и синтезированные биоактивные пептиды мировому фармацевтическому сообществу

меняться как для синтеза с N-конца, так и для синтеза с C-конца.

Заключительной стадией ТФПС является снятие полученного пептида с полимерного носителя. Наиболее широко применяемым методом отделения пептидов от полимера-носителя является использование бромистого водорода в трифторуксусной кислоте либо смесь трифторуксусной кислоты с хлористым метиленом (1:1), что повышает набухаемость полимера. Помимо этого, используют щелочные реагенты (в основном растворы NaOH различной концентрации в спиртах, диоксане, воде), аммонолиз, гидразинолиз и переэтерификацию в смеси MeOH—Et<sub>3</sub>N в ДМФА.

За более чем 60 лет стратегия ТФПС прошла длинный путь развития от классической схемы Б.Меррифилда до синтеза сложных полипептидных цепей, разработано большое число новых подходов и реагентов. Доступность чистых биоактивных пептидов и белков с помощью различных подходов к химическому синтезу позволила изучить их функции *in vivo* и *in vitro*. Однако исследования в этой области не останавливаются на достигнутом, ведется активный поиск новых подложек и ортогональных защитных групп для более универсального и высокоэффективного проведения синтеза. Разработка и внедрение усовершенствованных автоматических синтезаторов делает возможным не только получение сложных и длинных полипептидов в больших количествах, но и устраняет проблемы с воспроизводимостью и масштабируемостью реакций.

### ПЕПТИДНЫЕ СИНТЕЗАТОРЫ CSBIO

CSBio (США, Калифорния) – ведущая компания по производству автоматизированных пептидных синтезаторов с 1993 года поставляет оборудование и синтезированные биоактивные пептиды мировому фармацевтическому сообществу. Первый созданный в компании синтезатор работал на базе MS-DOS, в настоящее время системы CSBio совместимы с большим количеством современного программного обеспечения и подходят для решения различных задач от исследовательских проектов до промышленного производства (рис.9). Автоматические синтезаторы CSBio безотказно работают на протяжении многих лет, изготовлены из высококачественных материалов, позволяющих проводить сложные синтезы, и при этом отличаются простотой в использовании. Программное обеспечение оборудования постоянно обновляется и оптимизируется с учетом предложений ученых, непосредственно занимающихся синтезом пептидов.

В Россию оборудование CSBio поставляет независимое дочернее предприятие в Китае – CSBio (Shanghai) Ltd., где налажен лицензионный выпуск основных моделей, а также доступны услуги EPC-инжиниринга по разработке и внедрению кастомизированных промышленных решений. Это позволяет российским потребителям пользоваться оборудованием и технологиями пептидного синтеза мирового уровня без оглядки на санкции и по доступным ценам.

Наиболее востребованные модели – синтезаторы серий CSBio II для базового исследовательского уровня, CS136



**Рис.10.** Автоматический синтезатор пептидов CSBio II прост в использовании: сосуды с аминокислотами легко установить и заменить (а); цветовая индикация позволяет легко контролировать процесс (б)

для отработки процесса и мелкосерийного производства, а также синтезаторы CS536 для пилотных проектов. Рассмотрим каждую серию подробнее.

### CSBio II – базовый синтезатор пептидов

CSBio II – самая доступная на рынке модель автоматического синтезатора пептидов базового уровня, подходящая для небольшой лаборатории (рис.10). Отличается компактными размерами, простотой настройки и высокой производительностью.

CSBio II подходит для выполнения любого типа синтеза пептидов по Fmoc-стратегии, включая разветвленные пептиды, циклизированные пептиды, гликопептиды, n-метилпептиды, пептидонуклеиновые кислоты (ПНК), пептоиды, длинные пептиды (до 30 аминокислот), пептидные тиоэфиры и фосфопептиды. Реакционный сосуд CSBio II оснащен запатентованной двухкамерной системой барботирования азота для более полного контакта растворителя со смолой. Полностью автоматизированный синтез позволяет пользователю настраивать последовательность



**Рис.11.** Кондуктивный нагрев обеспечивает постоянство и равномерность изменения температуры в течение всего синтеза (а); реакционный сосуд CSBio II оснащен запатентованной двухкамерной системой барботирования азота для более полного контакта растворителя со смолой (б, в)

**Табл.2.** Основные технические характеристики синтезатора CSBio II

| Характеристика                                      | Параметры  |
|---|--|
| Резервуары для растворителя, мл                     | 250; 1000; 4000  |
| Выход синтезированного пептида, мг                  | 50–500   |
| Емкости с аминокислотами                            | 30 емкостей по 5 мл  |
| Масса прибора без растворов, кг                     | 43   |
| Габаритные размеры, Ш×В×Г, см                       | 79×58×49   |
| Варианты защиты мономеров                           | Fmoc   |
| Материалы, контактирующие с реакционными растворами | Полипропилен, ПТФЕ, нержавеющая сталь, боросиликатное стекло |
| Требуемая операционная система                      | Windows 10   |
| Расход растворителя для 20-мерного пептида, л/ммоль | <1   |
| Тип перемешивания                                   | Продувка азотом  |
| Реакционный сосуд, кол-во и объем, шт. × мл         | 1 × 15   |



**Рис.12.** Синтезаторы CS136M (а) и CS136X (б)

и возвращаться к ранее сохраненным синтезам. В среднем 20-мерный пептид синтезируется менее чем за 5 часов при экономичном расходе растворителя – менее 1 л при синтезе 0,1 ммоль (~175 мг). Синтезатор CSBio II использует кондуктивный нагрев как в реакционном, так и в передаточных сосудах, что позволяет растворителю поступать в реакционный сосуд предварительно нагретым. Кондуктивный нагрев обеспечивает постоянство температуры и равномерность нагрева в течение всего синтеза (рис.11). Цветовая индикация сосудов с аминокислотами наглядно демонстрирует задействованные в текущей операции образцы. За один цикл возможно получить от 50 до 150 мг готового продукта (табл.2).

CSBio II предназначен для пользователей, которым нужны пептиды в небольших количествах, он прост в использовании, имеет все необходимые протоколы синтеза, предварительно загруженные в синтезатор, и помещается в небольшом лабораторном пространстве. Это один из наиболее доступных полностью автоматизированных синтезаторов пептидов исследовательского масштаба на рынке.

### Серия CS136 – синтезаторы исследовательского уровня

Серия CS136 представлена двумя моделями – CS136X и CS136M (рис.12). Если CSBio II имеет реакционный сосуд объемом 15 мл, то CS136X может использоваться с реакционными сосудами размером от 20 до 200 мл (рис.13а), а также имеет три реакционных сосуда для параллельного синтеза. Модель CS136M позволяет вести параллельно до шести синтезов пептидов по различным протоколам. Перемешивание реакционной смеси в обеих моделях осуществляется за счет поворота реактора на 180° (рис.13б) и продувки азотом, как в модели CSBio II. Синтезаторы серии CS136 могут использоваться для НИОКР и мелкосерийного производства в больших объемах по стандартам GMP.

Основные узлы синтезатора – резервуарная камера с измерительными сосудами для точного измерения объема аминокислот и растворителей, передаточными сосудами для предварительного смешивания растворителей и активаторов перед связыванием, а также сами реакционные сосуды. Резервуарная камера CS136X вмещает 9 емкостей для растворителей и 22 емкости для растворов аминокислот. Фильтры, расположенные с каждой стороны реакционного сосуда, предотвращают вынос смолы во время смешивания или переноса растворителя.

Для работы синтезаторов требуются отдельный источник электроэнергии, система подготовки воздуха и азота и хорошая вентиляция (рис.13в). Азот



**Рис.13.** В CS136X могут использоваться реакционные сосуды от 20 до 200 мл (а); перемешивание реакционной смеси осуществляется поворотом реактора на 180° (б); для работы синтезаторов требуются отдельный источник электроэнергии, система подготовки воздуха и азота (в)

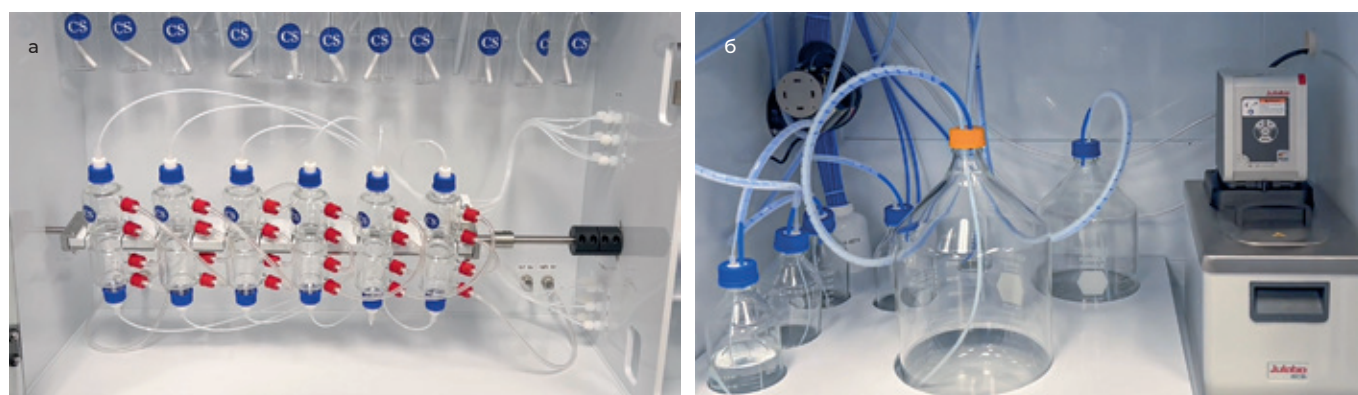
используется для перемешивания растворителя, а воздух – для управления пневматическими устройствами (клапанами и инверсионным смесительным рычагом), где нет контакта с реакционной средой или продуктом.

Используя программное обеспечение CSPEPM™ от CSBio, пользователи могут просматривать химическую последовательность пептидной цепи, синтезировать пептиды по собственным протоколам или использовать стандартные, а также выполнять кэпирование или двойное/тройное связывание отдельных аминокислот в пределах синтезируемой последовательности.

Для синтезатора CS136X доступна функция управления температурой синтеза, используя реакционные сосуды с рубашкой, можно запускать циркуляцию воды от 5 до 90 °C внутри рубашки в течение всего синтеза. Равномерное и регулируемое поддержание

нужной температуры реакционной смеси позволяет уменьшить или избежать рацемизации получаемого пептида.

Модель CS136M во многом похожа на модель CS136X, однако имеет некоторые отличия, например, способна одновременно вести до 6 синтезов пептидов (рис.14а), что особенно важно для исследовательских лабораторий, работающих в области создания и исследования различных вакцин. Синтезатор может комплектоваться циркуляционным термостатом с высокой производительностью насоса и увеличенным диапазоном рабочих температур для точного нагрева или охлаждения (рис.14б), причем температура жидкостей измеряется настраиваемыми датчиками в измерительном сосуде, в котором готовится смесь растворителей перед поступлением в передаточный и далее в реакционный сосуд. Для первичного промывочного раствора используется машина с 20-литровым сосу-



**Рис.14.** Модель CS136M одновременно синтезирует до 6 пептидов (а); может комплектоваться циркуляционным термостатом с высокой производительностью насоса и увеличенным диапазоном рабочих температур для точного нагрева или охлаждения (б)

Табл.3. Сравнение моделей серии CS136

| Характеристика  | Параметры  |                              |
|---|--|------------------------------|
|   | CS136X   | CS136M                       |
| Реакционные сосуды, мл  | 20; 50, 100; 200   | 20; 50; 100                  |
| Выход синтезированного пептида, ммоль                                     | 0,2–4  | 0,1–2                        |
| Емкости с аминокислотами (мономерами), количество и объем, шт. × мл       | 22 × 100   | 22 × 200                     |
| Максимальное количество реакционных сосудов, количество и объем, шт. × мл | 3 × 100 или 1 × 200  | 6 × 100                      |
| Сосуды для вспомогательных реагентов, количество и объем, шт. × л         | 1 × 5; 4 × 2; 2 × 1; 2 × 0,5                                 | 1 × 20; 1 × 10; 1 × 5; 4 × 1 |
| Емкости для растворителей, максимальное количество, шт.                   | 9  | 7                            |
| Масса прибора без растворов, кг   | 125  | 150                          |
| Габаритные размеры, Ш × В × Г, см   | 68 × 98 × 76   | 70 × 112 × 180               |
| Способ перемешивания реакционной смеси                                    | Поворот реактора на 180° и продувка азотом                   |                              |
| Варианты защиты мономеров   | Fmoc, tBoc   |                              |
| Материалы, контактирующие с реакционными растворами                       | Полипропилен, ПТФЕ, нержавеющая сталь, боросиликатное стекло |                              |

дом и калиброванным дозирующим насосом, которая обычно помещается рядом с вытяжным шкафом. Пользовательский интерфейс CS136M разработан



Рис.15. Пилотный синтезатор пептидов CS536X

таким образом, чтобы каждая синтезируемая последовательность пептидов была наглядно представлена на специальной вкладке с указанием номера реакционного сосуда.

Возможность CS136M вести одновременно 6 синтезов значительно повышает производительность любой исследовательской лаборатории, особенно если речь идет о наработке нескольких образцов для проведения испытаний (таб.3). В целом обе модели отличаются компактными размерами, большим количеством реакционных сосудов и позволяют легко и быстро получить любые пептидные последовательности.

### Пилотные синтезаторы пептидов

CS536X и CS936S – это пилотные пептидные синтезаторы, которые предназначены для производства единичных партий и используются для разработки и масштабирования процессов для мелкосерийного производства (рис.15).

С размерами реакционных сосудов от 200 мл до 2 л синтезатор CS536X может быть оснащен как системой перемешивания за счет инверсии на 180° для небольшого пилотного синтеза, как в моделях серии CS136, так и верхнеприводной мешалкой для больших объемов. Модели этой серии могут быть изготовлены на заказ и настроены в соответствии с потребностями пользователя. Стандартные комплектации включают в себя рециркуляцию растворителя, реакционные сосуды с рубашкой для автоматического управления нагревом, датчика перелива и все системные потребности

для производства биоактивных субстанций по стандарту GMP (табл.4).

### СИСТЕМЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ GELAI

Используя синтезаторы для твердофазного синтеза пептидов компании CSBio, можно получать любые структуры – линейные, циклические, разветвленные пептиды, пептиоиды, длинноцепочечные пептиды более чем из 100 аминокислот, используя оба типа защитных групп (Boc, Fmoc) с подходящими конденсирующими агентами. Точный контроль за проведением реакций и отсутствие побочных продуктов дает выход пептида, близкий к количественному. Однако, несмотря на высокую чистоту получаемого соединения (91-94%), зачастую необходима стадия дополнительной очистки.

Компания Chengdu Gelai High-tech Co., Ltd. (Китай) была основана в 2018 году. Входящие в ее структуру дочерние компании занимаются прикладными исследованиями, научными разработками и приборостроением. В настоящее время компания специализируется на научно-исследовательских разработках, производстве и продаже высокотехнологичного фармацевтического оборудования, включая ВЭЖХ,

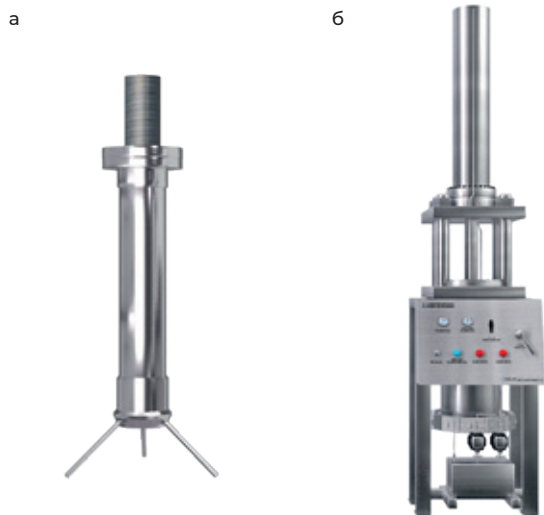


**Рис.16.** Лабораторные системы хроматографической очистки серии GL7000 SC

колонок для препаративной хроматографии и малогабаритные системы переработки высокочистых растворителей. В приложении к пептидному синтезу наиболее интересными для исследователей являются полупрепаративные и препаративные лабораторные системы хроматографического выделения и очистки GL7000 серии SC и DAC, а также система выделения пилотных и промышленных образцов GL7000.

**Табл.4.** Технические характеристики CS536X и CS936S

| Характеристика  | Параметры                    |                                  |
|---|------------------------------|----------------------------------|
|   | CS536X                       | CS936S                           |
| Реакционные сосуды, мл                                  | 200–2000                     | 2000–5000                        |
| Измерительные сосуды, количество и объем, шт. × мл      | 2 × 200                      | 2 × 1500                         |
| Емкости для переноса, количество и объем, шт. × л       | 2 × 0,25                     | 2 × 1,5                          |
| Емкости для аминокислот, количество и объем, шт. × л    | 22 × 0,25                    | 4 × 1 с автоматической промывкой |
| Емкости для растворителей, количество и объем, шт. × л  | 1 × 5; 3 × 2; 2 × 1; 2 × 0,5 | 3 × 5; 2 × 2; 2 × 1              |
| Емкости для растворителей, максимальное количество, шт. | 8                            | 7                                |
| Габаритные размеры, Ш × В × Г, см                       | 112 × 180 × 70               | 112 × 180 × 70                   |
| Вес прибора, кг   | 135                          | 160                              |



**Рис.17.** Колонки компании Gelai: а – специальные "пружинные" колонки серии SC; б – колонки динамического осевого сжатия для системы DAC

### Полупрепаративные системы хроматографического выделения и очистки GL7000

Системы используются для выделения и очистки целевых соединений из реакционной смеси после синтеза или из природных экстрактов. В отличие от аналитической хроматографии, в задачи препаративной и полупрепаративной систем входит не только обнаружение и идентификация отдельных компонентов, но и разделение смеси на отдельные компоненты с последующим их сбором для оценки, анализа и обработки. Приборы GL7000 успешно используются для очистки продуктов различных органических реакций и выделения фармакологически ценных компонентов из различных растительных экстрактов (рис. 16).

Обе системы обеспечивают эффективную очистку и разделение образцов от миллиграммовых до граммовых количеств, позволяют масштабировать условия разделения в препаративные количества (от мг до г), при этом значительно сокращается расход образцов, растворителей и возрастает полнота разделения (табл.5).

Важным преимуществом систем GL7000 является возможность использовать любые хроматографические методы разделения. Это особенно актуально при работе с растительными экстрактами, когда часть компонентов являются водорастворимыми и не могут быть разделены на колонке с нормальной фазой. Последовательное использование колонок с нормальной, для компонентов, растворимых в органических растворителях, и с обращенной

фазой (для водорастворимых) и даже ионообменных колонок, например для разделения солей органических кислот, позволяет проводить комплексное разделение всего экстракта, что полностью исключает потери компонентов и дает полное представление о составе растительного сырья. Компания Gelai может поставить и изготовить колонки необходимых размеров с широким ассортиментом сорбентов ведущих мировых производителей – Kromasil, Daisogel, Fuji, Nanomicro, Acchrom и др. Есть возможность заказать пустые колонки для использования сорбентов под конкретные задачи исследования. Для заказа доступны специальные "пружинные" колонки серии SC и колонки динамического осевого сжатия DAC (рис.17).

Системы GL7000 могут поставляться в различных конфигурациях: в стандартную компоновку прибора входят два насоса высокого давления, миксер, спектрофотометрический детектор с препаративной ячейкой, инжектор для ручного ввода пробы, препаративная колонка. Опционально могут быть добавлены третий насос для ввода пробы большого объема, линейные фильтры, автоматический коллектор фракций, который полностью исключает потери очищаемых компонентов раствора, набор инструментов для самостоятельного обслуживания прибора.

Полный пакет программного обеспечения имеет несколько уровней разной сложности – для начинающего пользователя и для профессионала, которые можно совмещать. Несомненным достоинством программы является ее интеграция с Microsoft Office, которая позволяет сохранять и обрабатывать данные в табличном формате Excel.

### Системы подготовки образцов для пилотных и промышленных проектов

В линейке приборов компании Gelai представлены две модели, рассчитанные на пилотные проекты GL7000-300ml и GL7000-500ml, а также модели для коммерческого производства от GL7000-1L и выше (см. табл.5), которые нашли применение в производстве фармацевтических препаратов, синтетических пептидов, белковых препаратов, а также могут использоваться для крупномасштабной очистки продуктов (рис.18).

Система GL7000-1L для мелкомасштабных проектов способна обеспечивать эффективное разделение продуктов массой приблизительно до сотен г, комплектуется колонкой DAC диаметром 150 или 200 мм. Промышленная установка GL7000-2L подходит для рутинного разделения продуктов массой до 1 кг и

**Табл.5.** Производительность серии GL7000

| Характеристика                                  | Параметры  |                                    |
|---|--|------------------------------------|
| <b>Насос</b>                                    |  |                                    |
| Макс. скорость потока, мл/мин.                  | 25; 50; 100 – исследовательские модели<br>300; 500 – пилотные модели<br>1000; 2000; 5000; 8000; 16000 – для промышленного производства                       |                                    |
| Рабочее давление, бар                           | 80   |                                    |
| Макс. давление, бар                             | 100  |                                    |
| Точность потока для смеси метанол/вода 80/20, % | ±2   |                                    |
| Функциональные особенности                      | Медленный старт и остановка<br>Автоматическое снижение давления при достижении критического значения<br>Автосохранение введенных пользовательских параметров |                                    |
| Энергопотребление                               | ~220 В ±10%, 50 Гц, 900 Вт и более (зависит от модели)   |                                    |
| <b>Детектор</b>                                 |  |                                    |
| Диапазон контролируемых длин волн, нм           | 190–700  |                                    |
| Точность установки, нм                          | ±1   |                                    |
| Уровень шума, AU (Absorbance Unit)              | 2 × 10 <sup>-5</sup>   |                                    |
| <b>Колонки</b>                                  | <b>Серия SC</b>  | <b>Серия DAC</b>                   |
| Внутренний диаметр, мм                          | 25; 38; 50; 77; 100  | 150; 200; 300; 450; 600; 900; 1200 |

может работать в комплекте с колонками DAC диаметром 200, 300 мм и более.

Обе системы могут использоваться в любых хроматографических методах разделения (нормальная, обращенная, ионообменная хроматография) и обеспечивают быструю и эффективную очистку фармацевтически ценных препаратов в масштабах малотоннажного производства.

\*\*\*\*

Как при исследовательских задачах, так и в коммерческом производстве пептидов важно совместить чистоту и выход продукта, высокую скорость синтеза и минимальное количество побочных процессов в системе. Синтезаторы компании CSBio контро-

лируют процесс синтеза, позволяют быстро и эффективно оптимизировать условия реакции и полностью исключают случаи невоспроизводимости результатов. А системы для препаративной хроматографии Gelai не только эффективно и быстро очищают полученные пептидные цепи, но и подходят для разделения и очистки даже таких сложных объектов, как многокомпонентное растительное сырье.

Официальный представитель CSBio и Gelai в России компания "ЭЛЕМЕНТ" занимает лидирующие позиции на российском рынке наукоемкого оборудования для различных исследовательских и производственных целей. За годы работы свыше тысячи организаций стали заказчиками компании, а в эксплуатацию на территории России успешно введено более 2000 единиц

а



б



**Рис.18.** Хроматографические системы очистки образцов: а – лабораторный препаративный хроматограф серии GL7000 в комплекте с колонкой GL-DAC150; б – промышленный препаративный хроматограф GL7000-2L

аналитического и технологического оборудования. Специалисты компании "ЭЛЕМЕНТ" не только обеспечивают надежную и максимально быструю поставку, но

и предоставляют полный пакет услуг по установке, подключению и обслуживанию приобретенных приборов и систем.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Curtius T. Ueber einige neue der Hippursäure analog constituirte, synthetisch dargestellte Amidosäuren // *Journal für Praktische Chemie*. 1882. Vol. 26. N. 1. P. 145–208.
2. Fischer E., Fourneau E. Über einige Derivate des Glykocolls, in Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899–1906) / E. Fischer, Editor. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg? 1906. P. 279–289.
3. Bergmann M., Zervas L. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*. 1932. Vol. 65. N. 7. P. 1192–1201.
4. Vigneaud V., Ressler C., Swan C.J.M. et al. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin // *Journal of the American Chemical Society*. 1953. Vol. 75. N. 19. P. 4879–4880.
5. McKay F.C., Albertson N.F. New amine-masking groups for peptide synthesis // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. Vol. 79. N. 17. P. 4686–4690.
6. Merrifield R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide // *J. Am. Chem. Soc.* 1963. Vol. 85. N. 14. P. 2149–2154.
7. Merrifield R.B. Solid-phase peptide synthesis. III. An improved synthesis of bradykinin // *Biochemistry*. 1964. Vol. 3. N. 9. P. 1385–1390.
8. Бабаев Е.В., Ермолатьев Д.С. Базовые приемы работы на твердой фазе: от азбуки пептидного синтеза к библиотекам неприродных аминокислот // *Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева*. 2009. № 5. С. 42–56.
9. Голосов Р.Д. Ключевые реагенты, применяемые в твердофазном синтезе пептидов // *Научное образование*. 2022. <https://na-obr.ru>
10. Мишин Г.П., Коршунова Г.А., Швачкин Ю.П. Успехи и проблемы твердофазного пептидного синтеза // *Успехи химии*. 1974. Вып. 11. С. 2014–2036.
11. Meldal M., Auzanneau F.-I., Hindsgaul O. et al. A PEGA resin for use in the solid-phase chemical-enzymatic synthesis of glycopeptides // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994. P. 1849–1850.
12. Darlak K., Wiegandt L.D., Czerwinski A. Facile preparation of disulfide-bridged peptides using the polymer-supported oxidant CLEAR-OXTM // *J. Peptide Res.* 2004. Vol. 63. P. 303–312.
13. Martin F.G., Quintanar-Audelo M., Garcia-Ramos Y. et al. ChemMatrix, a poly(ethyleneglycol)-based support for the solid-phase synthesis of complex peptides // *J. Comb. Chem.* 2006. Vol. 8. P. 213–222.
14. Sabatino G. Assessment of new 6-Cl-HOBT based coupling reagents for peptide synthesis. Part 1: Coupling efficiency study // *Letters in peptide science*. 2002. Vol. 9. P. 119–123.
15. Soural M., Hlaváč J., Krchňák V. Linkers for solid-phase peptide synthesis // *Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry*. 2011. P. 273–312.
16. Isidro-Llobet A., Álvarez M., Albericio F. Amino acid-protecting groups // *Chem. Rev.* 2009. Vol. 109. N. 6. P. 2455–2504.
17. Walter G. Production and use of antibodies against synthetic peptides // *J. Immun. Meth.* 1986. Vol. 88. P. 149.
18. Dryland A., Sheppard R.C. Peptide synthesis. Part 8. A system for solidphase synthesis under low pressure flow conditions // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. 1986. P. 125.
19. Behrendt R., Whiteb P., Offer J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis // *J. Pept. Sci.* 2016. Vol. 22. P. 4–27.

# ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ CSBio

## Автоматические твердофазные пептидные синтезаторы CSBio

### CSBio II

#### Автоматический синтез пептидов базового уровня

Полнофункциональный автоматизированный синтезатор пептидов для получения продукта в количестве от 50 мг до 500 мг. Самый доступный на рынке синтезатор для лабораторных применений. Не требует значительного опыта синтеза.

Синтезирует любые пептиды, включая разветвленные цепи, циклические, н-метилованные пептиды, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), пептоиды, пептидные тиоэферы, фосфопептиды и т.д.



Автоматический лабораторный синтезатор пептидов CSBio II

### Серия CS 136

#### Автоматический синтез пептидов для исследовательских задач

Основные области применения – научные исследования, отработка процессов синтеза, мелкосерийное производство.

Синтезирует любые пептиды, включая разветвленные цепи, циклические, н-метилованные пептиды, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), пептоиды, длинноцепочечные (>100 АК) пептиды, пептидные тиоэферы, фосфопептиды и т.д.

Использует инверсионное перемешивание (поворот емкости на 180°) для полного контакта смолы с растворителем. Выход продукта от 100 мг до 5 г.



Автоматический лабораторный синтезатор пептидов CS136X



Пилотный синтезатор пептидов CS536X

### Серия CS 536

#### Автоматический синтез пептидов для пилотных проектов

Предназначены для производства единичных партий, а также разработки и масштабирования процессов для мелкосерийного производства. Размеры реакционных сосудов от 200 мл до 2 л.

В зависимости от модели реакторы оснащены системой инверсионного перемешивания для небольшого пилотного синтеза либо верхнеприводной мешалкой для больших объемов.

Модели этой серии могут быть изготовлены на заказ и настроены в соответствии с потребностями пользователя. Стандартные комплектации включают рециркулятор растворителя, реакционные сосуды с рубашкой для автоматического управления нагревом, датчика перелива и все системные потребности для производства биоактивных субстанций по стандарту GMP.



# ПРЕПАРАТИВНЫЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ GELAI

## Лабораторные/пилотные системы серии GL7000

### Лабораторные и исследовательские модели серии GL7000



Полупрепаративная лабораторная система  
хроматографической наработки серии GL7000 (SC)

#### Производительность

Рутинное разделение образцов от миллиграммов до граммов.

Легкий перенос условий аналитического разделения на препаративный режим.

Любые хроматографические методы разделения: нормально-фазная, обращенно-фазная, ионообменная хроматография и др.

#### Области применения

Скрининг активных веществ в процессе исследования и разработки растительных лекарств, препаратов микробной ферментации, синтетических лекарств и т. д.

Извлечение и очистка биологически активных агентов из растительного сырья и продуктов бактериальной ферментации.

Очистка целевых компонентов, полученных в ходе химического синтеза.

#### Конфигурация

Насосы с широким диапазоном скоростей потока: 25/50/100 мл/мин.

Пружинные колонки CS диаметром 25/38/50/77/100.

### Препаративные модели серии GL7000 для пилотных проектов



Пилотная установка препаративной жидкостной  
хроматографии серии GL7000

#### Производительность

Подготовка продуктов от 1 до 100 граммов.

Проверка и отработка методов очистки и разделения методом жидкостной хроматографии в процессах очистки различного масштаба.

Любые хроматографические методы разделения: нормально-фазная, обращенно-фазная, ионообменная хроматография и др.

#### Области применения

Производство фармацевтической продукции: активных фармацевтических ингредиентов, пептидно-белковых препаратов, ферментативных и других синтетических лекарственных средств.

Фармацевтические полуфабрикаты, химические полуфабрикаты, пищевые добавки и др.

Исследование и оптимизация крупномасштабной очистки продукта.

#### Конфигурация

Насосы с диапазоном скоростей потока: 300 и 500 мл/мин.

Пружинные колонки CS или колонки динамического осевого сжатия DAC.

Подробная информация на сайте:



## Промышленные системы серии GL7000

### Производительность

Долговечный, высокоточный, безпульсационный взрывозащищенный мембранный насос.

Запатентованная технология вторичного принудительного распределения потока, высокая хроматографическая эффективность.

Индивидуальная разработка системы для максимальной эффективности производства.

### Области применения

Производство фармацевтической продукции: активных фармацевтических ингредиентов, пептидно-белковых препаратов, ферментативных и других синтетических лекарственных средств.

Фармацевтические полуфабрикаты, химические полуфабрикаты, пищевые добавки и т. д.

### Конфигурация

Стандартное/взрывозащищенное исполнение.

Производительность 1/2/5/8/16 л/мин.

Колонки динамического осевого сжатия DAC диаметром 150/200/300/450/600/900/1200 мм.



Взрывозащищенная промышленная система препаративной жидкостной хроматографии серии GL7000

## Колонки для препаративной хроматографии



Пружинные препаративные колонки SC

### Пружинные препаративные колонки SC

Для мелкомасштабных задач очистки и разделения в лабораториях научно-исследовательских институтов и фармацевтических компаний. Рутинная подготовка проб от миллиграммов до граммов.



Колонки динамического осевого сжатия DAC

### Колонки динамического осевого сжатия DAC

Для очистки и разделения веществ в лабораториях научно-исследовательских учреждений и фармацевтических компаний, а также средних и крупномасштабных промышленных производств.