



УДК 577.112.6:577.175.8'17

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДНОГО МОРФОГЕНА ГИДРЫ

Рубина А. Ю., Беспалова Ж. Д., Сепетов Н. Ф.,
Исакова О. Л., Молокоедов А. С., Титов М. И.,
Зайцев Д. А. *, Золотарев Ю. А. *

Всероссийский кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва:

* Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Классическими методами пептидной химии синтезирован пептидный морфоген гидры и разработана схема синтеза морфогена, меченного тритием. Полученные соединения однородны по ТСХ, имеют корректный аминокислотный состав, элюируются одним пиком в условиях ВЭЖХ, охарактеризованы величинами удельного вращения и спектрами $^1\text{H-NMR}$.

Пептид, активирующий рост головы гидры («head activator»), был впервые обнаружен при изучении морфогенетических процессов у пресноводной гидры [1]. Он представляет собой ундекапептид с молекулярной массой 1124 Да и последовательностью Glp-Pro-Pro-Gly-Gly-Ser-Lys-Val-Ile-Leu-Phe. Пептид с такой же аминокислотной последовательностью был выделен из гипоталамуса и кишечника крысы, быка и человека [2, 3], а также с помощью радиоиммунологических методов обнаружен в плазме крови человека [4, 5]. Это привело к появлению большого количества работ, посвященных изучению физиологической роли пептидного морфогена гидры (ПМГ), однако к настоящему времени его функции в организме млекопитающих не выяснены.

Широкое проведение исследований по выяснению механизма действия ПМГ требует значительных его количеств, которые могут быть получены только путем химического синтеза, а для изучения локализации и рецепции этого пептида необходим ПМГ, меченный радиоактивными изотопами.

С этой целью нами были разработаны схемы синтеза пептидного морфогена гидры (XIII) и, для последующего введения тритиевой метки, его аналога (XV), в котором остаток лизина в положении 7 заменен на остаток *L*-2,6-диамино-4-гексеновой кислоты (Dah). Dah вводили в реакцию в виде производного Fmoc-*L*-Dah(Boc)-OH (VI), которое получали из Ac-*L*,*D*-Dah(Boc)-OH [6].

Синтез соединений (XIII) и (XV) проводили по схеме 5 + 6, при этом N-концевой пентапептид являлся общим для морфогена гидры и его аналога (см. схемы 1 и 2). Фрагменты 1—5 и 6—11 были получены методом последовательного наращивания пептидной цепи с использованием *n*-нитрофениловых и пентахлорфениловых эфиров карбобензоксикарбоновых кислот. Для блокирования ϵ -аминогрупп лизина и 2,6-диамино-4-гексеновой кислоты использовали *трет*-бутилоксикарбонильную защиту. Фенилаланин вводили в реакцию в виде *трет*-бутилового эфира. Карбоксильную группу C-концевого глицина при синтезе фрагмента 1—5 защищали солеобразованием. Гидроксильную группу серина в случае синтеза морфогена оставляли незащищенной, а при синтезе [Dah³]ПМГ при-

Принятые сокращения: ПМГ — пептидный морфоген гидры; Glp — *L*-пироглутаминовая кислота; Dah — *L*-2,6-диамино-4-гексеновая кислота; Fmoc — 9-флуоренилметоксикарбонил; DMF — *N,N*-диметилформамид; DCC — *N,N'*-дициклогексикарбодимид; Np — *n*-нитрофенил; Pcp — пентахлорфенил; Pfp — пентафторфенил; HONB — *N*-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимид; «комплекс F» — кристаллический аддукт 1 моль DCC и 3 моль Pfp-OH; DMSO — диметилсульфоксид.

Схема 1
Синтез пептидного морфогена гидры (ПМГ)

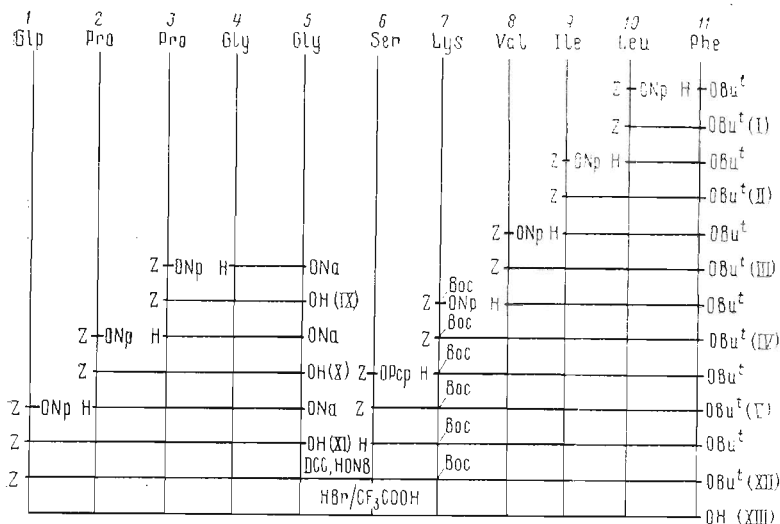
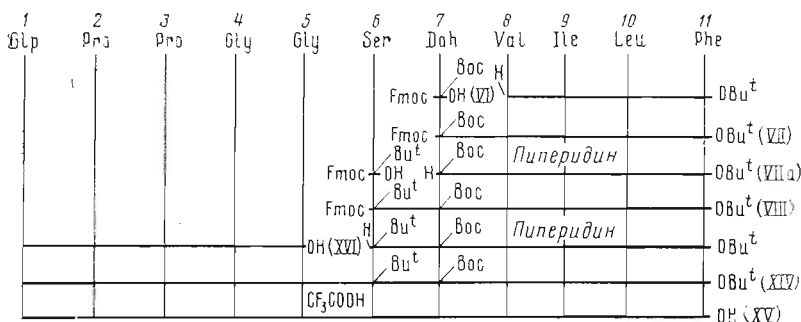


Схема 2*
Синтез аналога ПМГ для введения тритиевой метки [³H]ПМГ



В качестве конденсирующего агента при получении соединений (VII), (VIIa) и (XIV) использовали «комплекс F».

меняли *tert*-бутильную защиту. Отщепление защитных Z-групп на промежуточных стадиях проводили с помощью каталитического гидрогенолиза, Fmoc-группы удаляли обработкой пиперидином. Конденсацию фрагментов осуществляли карбодимидным методом в присутствии HONB либо с помощью «комплекса F». Конечные продукты, получаемые после снятия защитных групп бромистым водородом в трифторуксусной кислоте либо, в случае [³H]ПМГ, самой трифторуксусной кислотой подвергали очистке методом распределительной хроматографии на сефадексе G-25 или методом противоточного распределения на планетной centrifuge [7]. Синтезированные нами ПМГ, [³H]ПМГ, а также все промежуточные фрагменты имели корректный аминокислотный состав, были однородны при контроле методами ТСХ и ВЭЖХ (рис. 1). Полученные соединения охарактеризованы величиной удельного вращения и спектрами ¹H-ЯМР (рис. 2, 3, табл. 1—4).

Меченный тритием ПМГ получали методом твердофазного каталитического гидрогенолиза [³H]ПМГ при 160° С аналогично методике, описанной в работе [8]. В качестве катализатора использовали 5% Pd на BaSO₄. Полученный [³H]Lys]ПМГ выделяли методом ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (5 мкм; 4,6 × 250 мм). Контроль радиохимической чистоты осуществлялся методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в системе изопропанол — ацетон — NH₄OH, 6 : 4 : 1 (R_f 0,37, с обнаружением пятен по радиоактивности). Выход пептида с молярной радиоактивностью 63 Ки/ммоль составлял 26%. Радиохимическая чистота 96—98%.

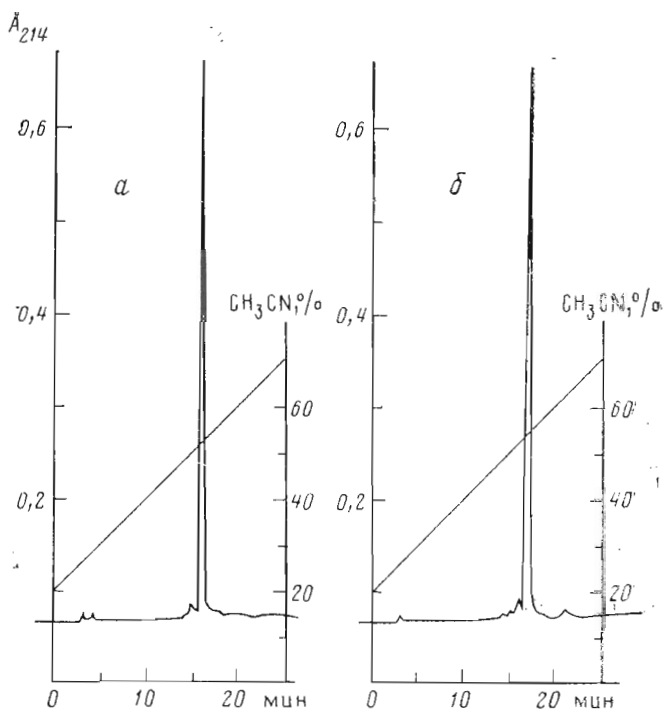


Рис. 1. ВЭЖХ: ПМГ (а) и [Dah⁷] ПМГ (б) на колонке Spherisorb ODS (5 мкм, 4,6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (20 → 70%) в 0,5 М КН₂Р₄ (рН 3,0). Скорость элюции 1 мл/мин

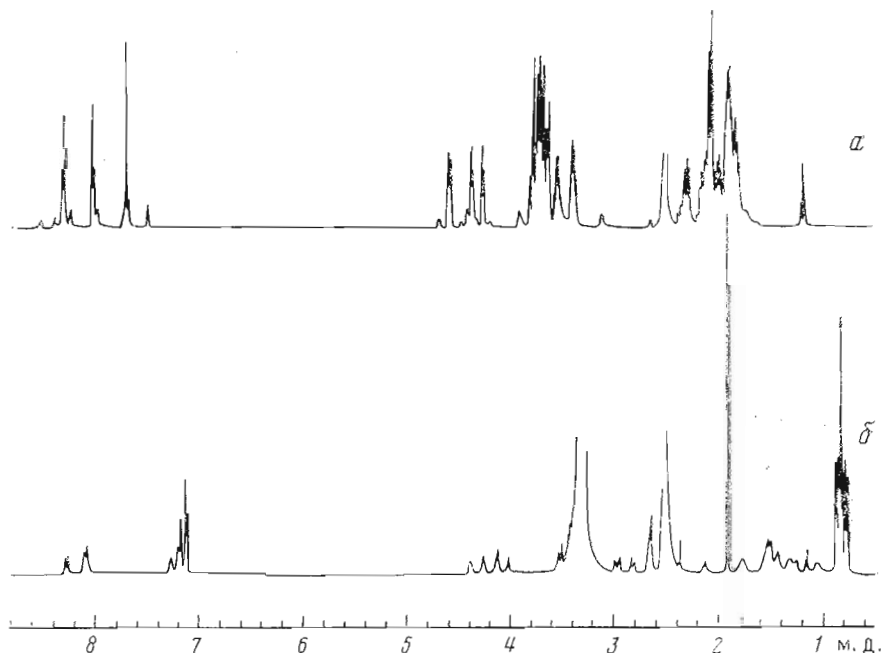


Рис. 2. Спектр ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆, 27° С) N-концевого фрагмента Glp-Phe-Phe-Gly-Gly-OH (XVI) (а) и С-концевого фрагмента H-Ser-Lys-Val-Ile-Leu-Phe-OH (XVII) (б)

Для контроля чистоты полученного продукта нами были подобраны условия аналитического разделения ПМГ и [Dah⁷]ПМГ. Разделение осуществлялось методом ВЭЖХ на двух последовательно соединенных колонках Ultrasphere IP (рис. 4). Поскольку ПМГ и [[³H]Lys]ПМГ хромото-

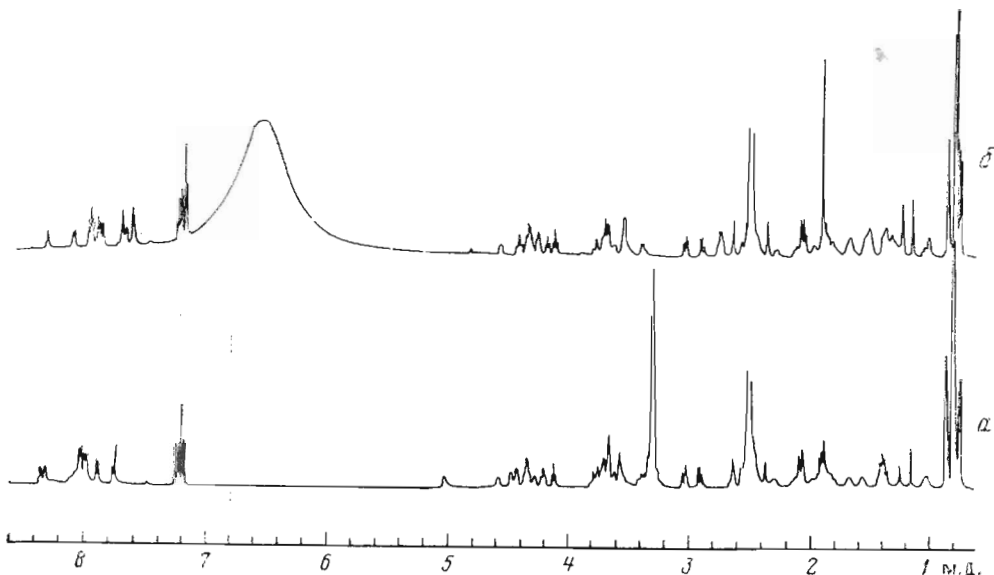


Рис. 3. Спектры ^1H -ЯМР (500 МГц, $\text{DMSO-}d_6$, 27°C) ПМГ (а) и $[\text{Dah}^7]\text{ПМГ}$ (б)

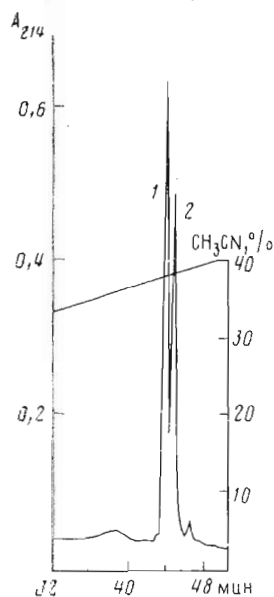


Рис. 4. ВЭЖХ смеси: ПМГ (1) и $[\text{Dah}^7]\text{ПМГ}$ (2) на двух последовательно соединенных колонках Ultrasphere IP (5 мкм, $4,6 \times 250$ мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (20 \rightarrow 40%) в 0,05 М KH_2PO_4 (рН 3,0), содержащем 5 мМ пентансульфонат натрия. Скорость элюции 0,5 мл/мин

графически идентичны, в подобранных условиях возможен контроль полноты тритирования $[\text{Dah}^7]\text{ПМГ}$ с точностью до 10%. ВЭЖХ полученного $[[^3\text{H}]\text{Lys}]\text{ПМГ}$ показала отсутствие исходного $[\text{Dah}^7]\text{ПМГ}$.

Таблица 1

Химические сдвиги (δ , м.д.) протонов N-концевого фрагмента ПМГ – Glp-Pro-Pro-Gly-Gly
 27°C , $\text{DMSO-}d_6$

Амино- кислотный остаток	NH	C^αH	C^βH	Другие протоны
Glp ¹	7.712	4.368	2.286; 1.892	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 2.061
Pro ²		4.583	2.140; 1.803	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1.880; $\text{C}^\delta\text{H}_2$ 3.384; 3.634
Pro ³		4.266	2.051; 1.835	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ 1.992; 1.888; $\text{C}^\delta\text{H}_2$ 3.535; 3.681
Gly ⁴	8.005	3.762; 3.665		
Gly ⁵	8.320	3.782; 3.642		

Химические сдвиги (δ , м. д.) протонов С-концевого фрагмента
ПМГ — Ser-Lys-Val-Ile-Leu-Pho
27° С, DMSO- d_6

Амино-кислотный остаток	NH	C α H	C β H	Другие протоны
Ser ¹		3,236	3,400; 3,302	
Lys ²	8,068	4,376	1,498; 1,786	C α H ₂ 1,299
Val ³	8,277	4,098	2,120	C α H ₃ 0,833
Ile ⁴	7,167	4,256	1,752	C α H ₂ 1,435; 1,045; C α H ₃ 0,821; C β H ₃ 0,750
Leu ⁵	8,098	4,112	1,500; 1,415	C α H 1,551; C β H ₃ 0,862; 0,78
Phe ⁶	7,234	3,990	2,805; 2,947	

Таблица 3

Химические сдвиги (δ , м. д.) протонов ПМГ
27° С, DMSO- d_6

Амино-кислотный остаток	NH	C α H	C β H	Другие протоны
Glp ¹	7,728	4,358	2,280; 1,889	C α H ₂ 2,057
Pro ²		4,581	2,128; 1,807	
Pro ³		4,272	2,061; 1,833	
Gly ⁴	8,326	3,716; 3,663		
Gly ⁵	7,974	3,787; 3,693		
Ser ⁶	7,919	4,340	3,547	
Lys ⁷	8,112	4,260	1,845	C α H ₂ 1,566; C β H ₂ 2,744
Val ⁸	7,700	4,185	1,900	C α H ₃ 0,788
Ile ⁹	7,915	4,124	1,667	
Leu ¹⁰	7,878	4,325	1,376	
Phe ¹¹	7,982	4,429	3,033; 2,896	

Таблица 4

Химические сдвиги (δ , м. д.) протонов аналога ПМГ — [Dah⁷]ПМГ
27° С, DMSO- d_6

Амино-кислотный остаток	NH	C α H	C β H	Другие протоны
Glp ¹	7,742	4,346	2,291; 1,888	C α H 2,067
Pro ²		4,583	2,130; 1,809	
Pro ³		4,275	2,071; 1,833	
Gly ⁴	8,346	3,738; 3,679		
Gly ⁵	7,990	3,793; 3,732		
Ser ⁶	8,031	4,337	3,571	
Dah ⁷	8,303	4,470	2,642; 2,535	
Val ⁸	7,759	4,207	1,912	C α H ₃ 0,788
Ile ⁹	7,988	4,116	1,664	C α H ₂ 1,024; 1,396; C β H ₃ 0,774; C α H ₃ 0,736
Leu ¹⁰	7,885	4,338	1,372	C α H 1,553; C β H ₃ 0,848; 0,790
Phe ¹¹	8,027	4,427	3,035; 2,896	

Полученный пептидный морфоген гидры проявил биологическую активность: влиял на репродуктивную функцию млекопитающих [9], участвовал в репаративной регенерации печени [10], стимулировал процессы заживления кожных ран [11] и др.

Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты и некоторые их производные фирм Reanal, Fluka, Serva. Индивидуальность полученных соединений проверяли методом ТСХ на хроматографических пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системах: хлороформ — метанол — уксусная кислота, 9 : 1 : 0,5 (А); хлороформ — метанол — 32% уксусная кислота, 60 : 45 : 20 (Б); хлористый метанол — метанол — 50% уксусная

кислота, 90 : 10 : 2 (В); хлористый метилен — метанол — 50% уксусная кислота, 14 : 6 : 1 (Г); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 45 : 20 : 6 : 11 (Д); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 3 : 1 : 1 (Е), этилацетат — метанол — вода, 5 : 2 : 1 (Ж), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 17 : 4,5 : 0,6 (З). Проявление проводилось последовательной обработкой хлором и смесью насыщенного раствора бензидаина в 2% уксусной кислоте и 0,05 М раствора нидристого калия в воде в соотношении 4 : 1. Растворы веществ в органических растворителях после экстракции и водных промывок сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали в вакууме на ротормом испарителе при температуре не выше 40° С. Конечные продукты очищали методом противотоочно-распределительной хроматографии на планетной центрифуге (США) [7] в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5; стационарная фаза органическая. Приведенные температуры плавления (не скорректированы) определяли на нагревательном приборе Вестинг (ГДР), а удельное оптическое вращение — на поляриметре Perkin — Elmer 241 (США). Гидролиз пептидов осуществляли в 6 н. HCl при 110° С в течение 24 ч. Анализ гидролизата проводился либо методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с предколлонной модификацией *o*-фталевым альдегидом [12], в этом случае содержание пролина не определялось (соединения V, XI, XIII), либо на аминокислотном анализаторе Biotronic 5001 (соединения VIII, XV). Заниженное содержание валина и изотецина вызвано повышенной устойчивостью к гидролизу связи Val-Phe. Анализ пептидов проводили на хроматографе Altex 334, детектирование — при длине волны 214 нм.

Индивидуальность полученных соединений подтверждена методом протонного магнитного резонанса. Спектры ^1H -ЯМР получены на спектрометре WM-500 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 500 МГц. Образцы для измерений готовили растворением 1 мг соединения в 0,5 мл диметилсульфоксида- d_6 . Все соединения в ацетатной форме. Перевод в катионную форму $[\text{Dab}^+]\text{PMG}$ обеспечивался добавлением в DMSO трифторуксусной кислоты (0,5% от общего объема). Химические сдвиги в спектрах ^1H -ЯМР измерены относительно внутреннего стандарта 2,2-диметил-2-силилпентан-5-сульфоната натрия. Отнесение сигналов в спектрах сделано с помощью метода двойного резонанса. Широкий сигнал при 6,6 м.д. (рис. 3б) относится к протонам HO_2 , находящимся в быстром обмене с протонами трифторуксусной кислоты.

Z-Leu-Phe-OBu^t (I). К раствору 1,29 г (5 ммоль) $\text{HCl}\cdot\text{H-Phe-OBu}^t$ в 10 мл диметилформамида добавляли 0,69 мл (5 ммоль) Et_3N . Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат охлаждали до -10°C и добавляли 1,93 г (5 ммоль) *Z-Leu-ONr* в 10 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 20° С. DMF упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 2% H_2SO_4 водой. Этилацетатную фракцию упаривали, переупаривали с изопропанолом. Образовавшееся масло растворяли в метаноле и обрабатывали амберлитом IRA-410 в OH^- -форме до исчезновения *n*-нитрофенола по данным ТСХ. Смола отфильтровывали, промывали на фильтре метанолом, фильтрат упаривали и полученное масло сушили в вакууме. Получено 2,30 г (98%) соединения (I). R_f 0,79 (А).

Z-Phe-Leu-Phe-OBu^t (II). 2,30 г (4,9 ммоль) соединения (I) гидрировали 1,5 ч в 70 мл метанола в присутствии 10% Pd на активированном угле (Fluka, Швейцария). Отфильтровывали катализатор, фильтрат упаривали, оставшееся масло растворяли в DMF. Раствор охлаждали до -10°C и добавляли 1,73 г (4,6 ммоль) *Z-Phe-ONr* в 10 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 20° С. После упаривания остаток растворяли в этилацетате, промывали 2% H_2SO_4 водой, упаривали с изопропанолом. Полученное масло растворяли в метаноле и обрабатывали амберлитом IRA-410 в OH^- -форме. Смола отфильтровывали, промывали на фильтре метанолом. Фильтрат упаривали, остаток растворяли в эфире, осаждали гексаном и сушили. Получено 2,33 г (87%) соединения (II) с т. пл. 149—150° С, $[\alpha]_D^{22} -11,5^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,78 (А), 0,72 (В).

Z-Val-Ile-Leu-Phe-OBu^t (III). 1,75 г (3,00 ммоль) соединения (II) гидрировали в 50 мл метанола в присутствии 10% Pd/C. Отфильтровывали катализатор, фильтрат упаривали, масло растворяли в DMF. Раствор охлаждали до -10°C и добавляли 1,06 г (2,85 ммоль) *Z-Val-ONr* в 10 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 20° С. После упаривания остаток нагревали в этилацетате, образовавшийся аморфный осадок отфильтровывали и промывали на фильтре гексаном. Эту процедуру повторяли дважды. После высушивания получено 1,70 г (88%) соединения (III) с т.пл. 220—221° С, $[\alpha]_D^{22} -12,7^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,76 (А), 0,72 (В).

Z-Lys(Boc)-Val-Ile-Leu-Phe-OBu^t (IV). 1,89 г (2,8 ммоль) соединения (III) гидрировали в 50 мл DMF в присутствии 10% Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат охлаждали до -10°C и добавляли 1,65 г (3,3 ммоль) *Z-Lys(Boc)-ONr* в 15 мл DMF. Выдерживали 40 ч при 20° С. После упаривания растворителя остаток нагревали в этилацетате, образовавшийся аморфный осадок отфильтровывали, промывали на фильтре гексаном, сушили. Получено 2,40 г (94%) соединения (IV) с т.пл. $>260^\circ\text{C}$ (с разложением); $[\alpha]_D^{22} -15,4^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,76 (А), 0,72 (В).

Z-Ser-Lys(Boc)-Val-Ile-Leu-Phe-OBu^t (V). 2,33 г (2,56 ммоль) соединения (IV) гидрировали в 70 мл DMF в присутствии 10% Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат охлаждали до -10°C и добавляли 1,45 г (3,00 ммоль) *Z-Ser-ONr* [13] в 8 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 20° С, упаривали, остаток нагревали в смеси метанол — этилацетат (1 : 1). Выпавший аморфный осадок отфильтровывали, промывали на фильтре гексаном, сушили. Получено 2,20 г (88%) соединения (V); $[\alpha]_D^{22} -18,3^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,63 (А), 0,94 (Б), 0,51 (В). Аминокислотный анализ: Ser 1,00 (1); Val 0,51 (1); Phe 1,00 (1); Ile 0,49 (1); Leu 1,02 (1); Lys 1,04 (1).

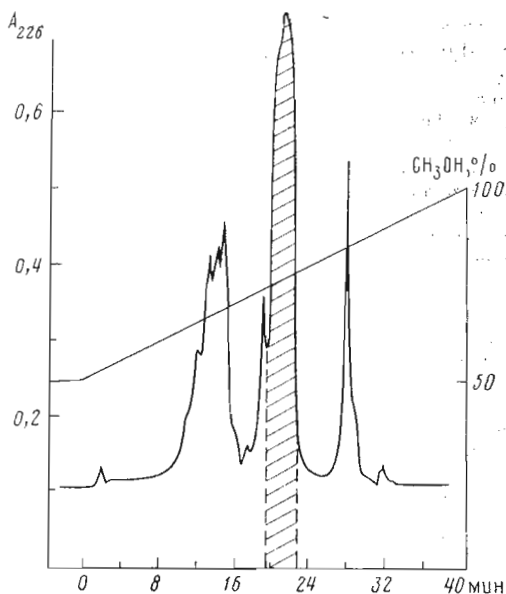


Рис. 5. Препаративная ВЭЖХ Fmoc-L-Dah(Boc)-OH на колонке с силасорбом RP₁₈ (7,5 мкм, 16 × 250 мм) в системе 0,1% водная CF₃COOH (A) — метанол, содержащий 0,1% CF₃COOH (B); градиент B 50 → 100% за 40 мин. Скорость элюции 10 мл/мин. Отмечена выделяемая фракция

Fmoc-Dah(Boc)-OH (VI). 610 мг (2,14 ммоль) Ac-L,D-Dah(Boc)-OH растворяли в 2,14 мл 1 н. NaOH и добавляли 30 мл 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,0). К раствору добавляли 30 мг ацилазы (технический препарат, ВНИИА) и выдерживали 20 ч при 20° С. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в насыщенном водном растворе NaHCO₃ и при перемешивании добавляли по каплям 369 мг (1,10 ммоль) Fmoc-ONSu [14] в 5 мл диоксиана. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 20° С, экстрагировали эфиром. Водную фракцию подкисляли конц. H₂SO₄ до pH 2 и экстрагировали этилацетатом. Органическую фракцию промывали водой, упаривали. Полученную смесь Fmoc-L-Dah(Boc)-OH и Ac-D-Dah(Boc)-OH разделяли на колонке Silasorb C-18 (7,5 мкм) (см. рис. 5). Fmoc-L-Dah(Boc)-OH кристаллизовали из смеси эфир — гексан. Получили 295 мг (59%) соединения (VI) с т. пл. 126—127° С, $[\alpha]_D^{22} +24,0^\circ$ (с 1, AcOH); R_f 0,78 (Ж), 0,85 (З).

Fmoc-Dah(Boc)-Val-Ile-Leu-Phe-OBu^t (VII). 300,0 мг (0,44 ммоль) соединения (III) гидрировали в 30 мл DMF в присутствии 10% Pd/C. Катализатор отфильтровывали, к фильтрату добавляли 205,2 мг (0,44 ммоль) соединения (VI). Смесь охлаждали до -25° С и при перемешивании добавляли 1,267 г (1,32 ммоль) «комплекса F» в 5 мл DMF. Выдерживали 30 мин при -25° С, 20 ч при 4° С и 20 ч при 20° С. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром. Перекристаллизовывали из смеси DMF с эфиром. Получено 218,7 мг (50%) соединения (VII) с т. пл. 209—210°, $[\alpha]_D^{22} -15,0^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,68 (A), 0,90 (З).

Fmoc-Ser(Bu^t)-Dah(Boc)-Val-Ile-Leu-Phe-OBu^t (VIII). 124,3 мг (1,25 ммоль) соединения (VII) растворяли в 10 мл DMF и добавляли 125 мкл пиперидина. Выдерживали 15 мин при 20° С, после чего DMF упаривали. Остаток кристаллизовали из смеси этилацетат — эфир — гексан (1 : 3 : 10). Получили 90 мг (93%) H-Dah(Boc)-Val-Ile-Leu-Phe-OBu^t (VIIa), R_f 0,76 (З). Соединение (VIIa) растворяли в 10 мл DMF и добавляли 44,8 мг (1,20 ммоль) Fmoc-Ser(Bu^t)-OH [14]. Смесь охлаждали до -25° С и при перемешивании добавляли раствор 345,6 мг (3,60 ммоль) «комплекса F» в 3 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 30 мин при -25° С, 20 ч при 4° С и 40 ч при 20° С. DMF упаривали, остаток кристаллизовали из смеси DMF с эфиром (1 : 10). Получено 122,9 мг (90%) соединения (VIII), $[\alpha]_D^{22} -26,4^\circ$ (с 1, AcOH); R_f 0,59 (A), 0,89 (Ж). Аминокислотный анализ: Ser 0,64 (1); Val 0,89 (1); Ile 0,89 (1); Leu 1,00 (1); Phe 1,00 (1).

Z-Pro-Gly-Gly-OH (IX). 13,31 г (50 ммоль) Z-Gly-Gly-OH гидрировали 2 ч в 200 мл метанола в присутствии 10% Pd/C, после чего добавляли 50 мл 1 н. NaOH. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в смеси DMF с водой. К охлажденному до -10° С раствору добавляли 18,52 г (50 ммоль) Z-Pro-ONp в 40 мл DMF, перемешивали 20 ч при 20° С. После упаривания остаток растворяли в воде и трижды экстрагировали эфиром. Водную фракцию подкисляли конц. H₂SO₄ до pH 2 и экстрагировали *n*-бутанолом. Органическую фракцию трижды промывали водой, упаривали. Остаток кристаллизовали из смеси этилацетата с гексаном. Полу-

чено 16,00 г (88%) соединения (IX) с т.пл. 132—133° С; $[\alpha]_D^{22}$ —27,5° (с 1, DMF); R_f 0,74 (В), 0,13 (В), 0,64 (Г), 0,55 (Д).

Z-Pro-Pro-Gly-Gly-OH (X). 1,14 г (3,0 ммоль) соединения (IX) гидрировали 1 ч в 50 мл метанола в присутствии 10% Pd/C, затем добавляли 3 мл 1 н. NaOH. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали и остаток растворяли в 10 мл DMF. К охлажденному до —10° С раствору добавляли 1,22 г (3,3 ммоль) Z-Pro-ONp в 10 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 20° С. После упаривания остаток растворяли в воде и трижды экстрагировали эфиром. Водную фракцию подкисляли конц. H₂SO₄ до pH 2 и экстрагировали *n*-бутанолом. Органическую фракцию трижды промывали водой, упаривали. Остаток кристаллизовали из смеси этилацетата с гексаном, перекристаллизовывали из смеси этилацетата с эфиром. Получено 1,09 г (79%) соединения (X) с т.пл. 46—47° С; $[\alpha]_D^{22}$ —41,1° (с 1, DMF); R_f 0,78 (В), 0,11 (В), 0,60 (Г), 0,42 (Д).

Z-Glp-Pro-Pro-Gly-Gly-OH (XI). 921 мг (2 ммоль) соединения (X) гидрировали 1 ч в 30 мл метанола в присутствии 10% Pd/C, затем добавляли 2 мл 1 н. NaOH. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали и остаток растворяли в 15 мл DMF. К охлажденному до —10° С раствору добавляли 769 мг (2 ммоль) Z-Glp-ONp [15] в 10 мл DMF. Выдерживали 20 ч при 20° С. После упаривания остаток растворяли в воде и трижды экстрагировали эфиром. Водную фракцию обрабатывали дауэксом 50W × 8 в H⁺-форме. Смола отфильтровывали, промывали на фильтре водой, фильтрат упаривали. Остаток растворяли при нагревании в смеси изопропилового спирта с этилацетатом и добавляли гексан. При охлаждении раствора выпали кристаллы. Осадок отфильтровывали, промывали гексаном, сушили. Получено 980 мг (86%) соединения (XI) с т.пл. 118—119° С; $[\alpha]_D^{22}$ —69,8° (с 1, DMF); R_f 0,78 (В), 0,04 (В), 0,38 (Г), 0,28 (Д). Аминокислотный анализ: Glu 1,00 (1); Gly 2,06 (2).

Z-Glp-Pro-Pro-Gly-Gly-Ser-Lys(Boc)-Val-Ile-Leu-Phe-OBu^t (XII). 550 мг (0,55 ммоль) защищенного гексапептида (V) гидрировали в 50 мл DMF в присутствии 10% Pd/C. Катализатор отфильтровывали, к фильтрату добавляли 316 мг (0,55 ммоль) пентапептида (XI) и 394 мг (2,20 ммоль) HONB (Fluka, Швейцария). Реакционную смесь охлаждали до —25° С и при интенсивном перемешивании добавляли охлажденный до той же температуры раствор 231 мг (1,1 ммоль) DCC в 5 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при —25° С, затем выдерживали 20 ч при 4° С. Выпавший осадок N,N'-дипицологексимочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток обрабатывали 2% H₂SO₄, выпавший аморфный осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой, эфиром, сушили. Получено 610 мг (98%) соединения (XII), R_f 0,49 (Е), 0,57 (З).

Glp-Pro-Pro-Gly-Gly-Ser-Lys-Val-Ile-Leu-Phe-OH (XIII). 690 мг (0,49 ммоль) соединения (XII) растворяли в 25 мл трифторуксусной кислоты и пропускали ток сухого бромистого водорода в течение 45 мин. Трифторуксусную кислоту упаривали, масло растирали с эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром и растворяли в 10% уксусной кислоте. Раствор обрабатывали дауэксом 50W × 8 в ацетатной форме до исчезновения реакции на Br⁻. Смола отфильтровывали, промывали 10% уксусной кислотой, фильтрат упаривали. Остаток растворяли при нагревании в смеси изопропилового спирта с водой. Выпавший аморфный осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, сушили. Получено 460 мг соединения (XIII), которое подвергается очистке на планетной центрифуге методом противоточного распределения. Получено 269 мг (55%) соединения (XIII), $[\alpha]_D^{22}$ —91,8° (с 1,50% AcOH), R_f 0,49 (В), 0,11 (Д), 0,35 (Е). Аминокислотный анализ: Glu 0,98 (1); Ser 0,97 (1); Gly 2,17 (2); Val 0,52 (1); Phe 1,00 (1); Ile 0,52 (1); Leu 1,04 (1); Lys 1,05 (1). ¹H-ЯМР-спектр см. рис. 3а, табл. 3.

Glp-Pro-Pro-Gly-Gly-Ser(Bu^t)-Dah(Boc)-Val-Ile-Leu-Phe-OBu^t (XIV). 41,5 мг (0,036 ммоль) соединения (VIII) растворяли в 3 мл DMF и добавляли 35 мг индерицина. Выдерживали 15 мин при 20° С, после чего реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 5 мл DMF и добавляли 16,6 мг (0,036 ммоль) Glp-Pro-Pro-Gly-Gly-OH (XVI). Смесь охлаждали до —25° С и при перемешивании добавляли 104,0 мг (0,11 ммоль) «комплекса F» в 3 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 30 мин при —25° С, 20 ч при 4° С, 20 ч при 20° С. Выпавший аморфный осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром. Получено 33,9 мг (70%) соединения (XIV), R_f 0,60 (Е).

Glp-Pro-Pro-Gly-Gly-Ser-Dah-Val-Ile-Leu-Phe-OH (XV). 33,9 мг (0,03 ммоль) соединения (XIV) растворяли в 5 мл трифторуксусной кислоты и выдерживали 40 мин при 20° С. Раствор упаривали, остаток растирали с эфиром. Полученный осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром. Полученное вещество подвергают очистке на колонке (10 × 250 мм) Ultrasphere ODS в условиях, указанных на рис. 4б. Получено 23,6 мг (70%) соединения (XV), $[\alpha]_D^{22}$ —78,2° (с 1, AcOH), R_f 0,52 (В), 0,13 (Д), 0,36 (Е). Аминокислотный анализ: Ser 0,79 (1); Glu 0,95 (1); Pro 1,95 (2); Gly 2 (2); Val 0,91 (1); Ile 0,99 (1); Leu 1,04 (1); Phe 1,04 (1). ¹H-ЯМР-спектр см. рис. 3б, табл. 4.

Glp-Pro-Pro-Gly-Gly-OH (XVI). 57 мг (0,1 ммоль) соединения (XI) гидрировали 1 ч в 10 мл метанола в присутствии 10% Pd на активированном угле. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в изопропанолу и осаждали эфиром. Сушили в вакуум-эксикаторе над NaOH. Получено 35 мг (79%) соединения (XVI), $[\alpha]_D^{22}$ —103,3° (с 1, AcOH), R_f 0,51 (В), 0,31 (З). ¹H-ЯМР-спектр см. рис. 2а, табл. 1.

H-Ser-Lys-Val-Ile-Leu-Phe-OH (XVII). 100 мг (0,4 ммоль) соединения (V) обрабатывали аналогично методике для получения соединения (XIII). После обработки смолой фильтрат упаривали, остаток растворяли в смеси метавол — уксусная кислота (1 : 1) и осаждали эфиром. Получено 60 мг (85%) соединения (XVII), $[\alpha]_D^{25} = -33^\circ$ (с 1, АсОН), R_f 0,29 (E). $^1\text{H-NMR}$ -спектр см. рис. 26, табл. 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schaller H. C., Bodenmuller H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. No 11. P. 7000—7004.
2. Bodenmuller H., Schaller H. C. // Nature. 1981. V. 293. No 5833. P. 579—580.
3. Bodenmuller H., Zachmann B. // FEBS Lett. 1983. V. 59. No 1—2. P. 237—240.
4. Roberge M., Escher E., Schaller H. C., Bodenmuller H. // FEBS Lett. 1984. V. 173. No 2. P. 307—313.
5. Bodenmuller H., Roberge M. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 825. No 3. P. 261—267.
6. Nassal M., Buc P., Wieland Th. // Lieb. Ann. Chem. 1983. H. 9. S. 1524—1532.
7. Ito Y., Bowman R. L. // Analyt. Biochem. 1977. V. 82. No 1. P. 63—68.
8. Петренко Б. В., Золотарев Ю. А., Мясоедов Н. Ф., Беспалова Ж. Д., Молокоедов А. С., Ярыгин К. Н. // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. No 12. С. 1615—1619.
9. Виноградов В. А., Дегтярь О. Г., Кривошеев О. Г., Рубина А. Ю., Беспалова Ж. Д., Титов М. И. // Пробл. эндокринологии. 1987. № 3. С. 66—70.
10. Ярыгин К. Н., Казимирский А. П., Косицкий Г. И., Рубина А. Ю., Виноградов В. А., Пылаев А. С. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1986. Т. 101. № 6. С. 680—682.
11. Спевак С. Е., Соловьева А. И., Рубина А. Ю., Беспалова Ж. Д. // Онтогенез. 1988. В печати.
12. Utgat H., Kucera P., Wen L.-F. // J. Chromatogr. 1982. V. 239. No 2. P. 463—474.
13. Kovacs J., Ceprini M. Q., Duprar C. A., Schmit G. N. // J. Org. Chem. 1967. V. 32. No 11. P. 3696—3698.
14. Sigler G. F., Fuller W. D., Charaturvedi N. C., Goodman M., Verlander M. // Biopolymers. 1983. V. 22. No 10. P. 2157—2162.
15. Gibian H., Klieger E. // Lieb. Ann. Chem. 1961. B. 640. H. 1—3. S. 145—156.

Поступила в редакцию
22.X.1987
После доработки
2.II.1988

SYNTHETIC STUDIES OF THE ACTIVATOR OF HYDRA

RUBINA A. Yu., BESPALOVA Z. D., SEPETOV N. F.,
ISAKOVA O. L., MOLOKOEDOV A. S., TITOV M. I.,
ZAITSEV D. A.*, ZOLOTAREV Yu. A.*

All-Union Cardiology Research Centre, Academy of Sciences
of the USSR; * Institute of Molecular Genetics, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

An 11-membered peptid, the head activator of hydra, was synthesized by conventional solution method. Scheme for preparation of the H^3 -labelled morphogene was developed. The peptide was characterized by TLC, HPLC, optical rotation, and high resolution NMR (500 MHz) methods.