



УДК 577.175.85'17:547.964.4.057

БОМБЕЗИН АМФИБИЙ И ЕГО АНАЛОГ АЛИТЕЗИН

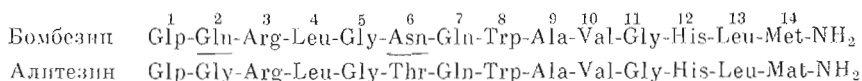
*Куранова И. Л., Чуркина С. И., Людмирова В. Л.,
Филонова Е. Б., Мутулис Ф. Г.*, Лиешини Э. Э.*,
Секацис И. П.*, Саулитис Ю. Б.*, Григорьева В. Д.**

*Ленинградский государственный университет;
Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Разработана схема синтеза бомбезина амфибий и бомбезиноподобного пептида алитезина. Бомбезин был синтезирован по схемам 5+(5+4) и 5+(6+3) методом смешанных ангидридов и карбодимидным методом в присутствии N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксиамида, а алитезин — по схеме 5+(5+4) методом смешанных ангидридов. Структура синтезированных пептидов подтверждена данными спектров ¹H-ЯМР высокого разрешения.

Синтезированные бомбезин и бомбезин-(6-14)-пептид проявляют мощный гипотермический эффект и оказывают влияние на секреторную функцию поджелудочной железы. Алитезин обладает сравнимым с бомбезином гипотермическим действием, но значительно слабее влияет на секрецию поджелудочной железы. N-Концевые пентапептиды бомбезина и алитезина не оказывают влияния ни на терморегуляцию, ни на секреторную функцию поджелудочной железы.

Бомбезин и алитезин впервые были выделены В. Эрспамером и сотр. в 1971 г. из кожи лягушек *Bombina bombina* и *Alytes obstetricans* [1, 2] соответственно. Среди бомбезиноподобных пептидов алитезин имеет наиболее близкую к бомбезину структуру и является его аналогом. Они различаются двумя аминокислотными остатками во 2-м и 6-м положениях:



В дальнейшем бомбезин и другие бомбезиноподобные пептиды были обнаружены радиоиммунохимическими и иммуноцитологическими методами в организме млекопитающих — в частности, в мозге, желудочно-кишечном тракте, в легких [3-6]. Найден бомбезин и в сыворотке крови крысы, кролика и человека. У амфибий источником бомбезина помимо кожи могут быть ткани желудочно-кишечного тракта и головной мозг [7].

Впервые бомбезин был синтезирован Л. Бернарди и соавт. в 1971 г. [8] азидным методом. В дальнейшем бомбезин и его аналоги получали как твердофазным [9, 10], так и классическим методом в растворе [11-16]. Синтез алитезина был осуществлен только твердофазным методом [9].

Отсутствие отечественных препаратов бомбезина и бомбезиноподобных пептидов до последнего времени препятствовало исследованию в нашей стране их физиологических эффектов, что и обусловило целесообразность полного химического синтеза бомбезина и алитезина.

Синтез проводился классическим методом в растворе блочным способом, исходя из фрагментов 1-5 и 6-14 с использованием тактики минимальной защиты.

В процессе синтеза в качестве защитных групп для α-аминофункции использовали *трет*-бутилоксикарбонильную и бензилоксикарбонильную

Сокращения: Np — *n*-нитрофенил, Pfp — пентафторфенил, HONSu — N-гидросукцинимид, DCHA — N,N-дициклогексилламин, DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, DMF — N,N-диметилформамид, DMSO — диметилсульфоксид, HONB — N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимид, KCCB — константа спин-спинового взаимодействия.

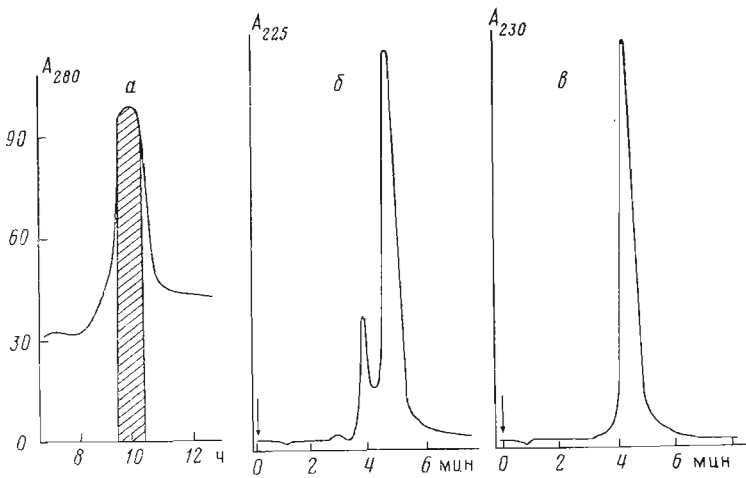
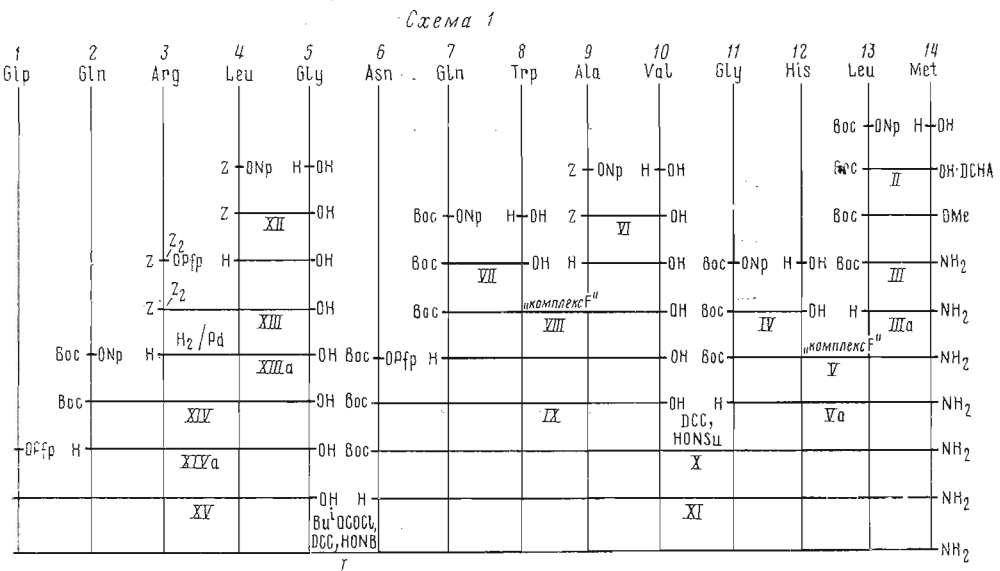


Рис. 1. Хроматографическая очистка бомбезин-(6-14)-пептида (XI), полученного по схеме 5+4: *a* – ионообменная хроматография на колонке (1,3×23 см) с SP-сефадексом С-25 в пиридин-ацетатном буфере (рН 5,2) в градиентном режиме в интервале концентрации буфера 0,05–1,0 М, скорость элюирования 30 мл/ч, детекция при 280 нм (запикширована выделяемая фракция); *б* – аналитическая ВЭЖХ (после ионообменной хроматографии): Zorbax C₈, колонка 0,46×15 см, элюент: 22% CH₃CN – 78% 0,2 М CH₃COONH₄, скорость элюции 2 мл/мин, детекция при 225 нм; *в* – аналитическая ВЭЖХ (условия те же, что и в «б») после препаративной ВЭЖХ на колонке (2,1×25 см) с Zorbax C₈, элюент: 19% CH₃CN – 81% 0,2 М CH₃COONH₄, скорость элюции 20 мл/мин, детекция при 230 нм

группы. Имидазольное кольцо гистидина блокировали Вос-группой. Карбоксильные группы С-концевых аминокислотных остатков отдельных фрагментов защищали солеобразованием.

При синтезе фрагментов использовали как метод ступенчатого наращивания пептидной цепи на один аминокислотный остаток, так и метод блочной конденсации (схемы 1 и 2).

При получении бомбезин-(6-14)-пептида (XI) была опробована схема 5+4 (схема 1) (результаты синтеза по этой схеме сообщены нами ранее [17]). Конденсация фрагментов 6-10 (IX) и 11-14 (V) осуществлялась карбодимидным методом в присутствии N-гидроксисукцинимиды. После деблокирования продукта реакции и очистки методом ионообменной хроматографии, а затем ВЭЖХ был выделен препарат нонапептида



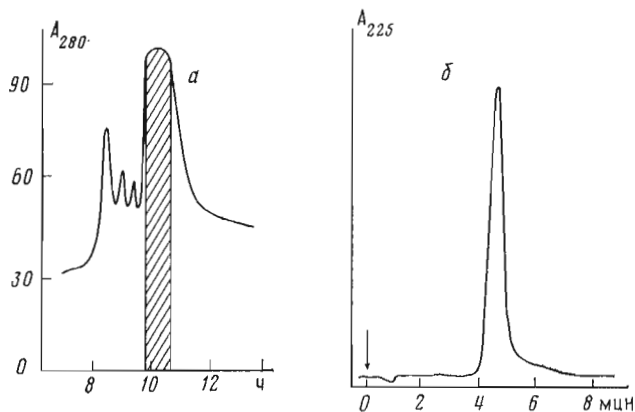
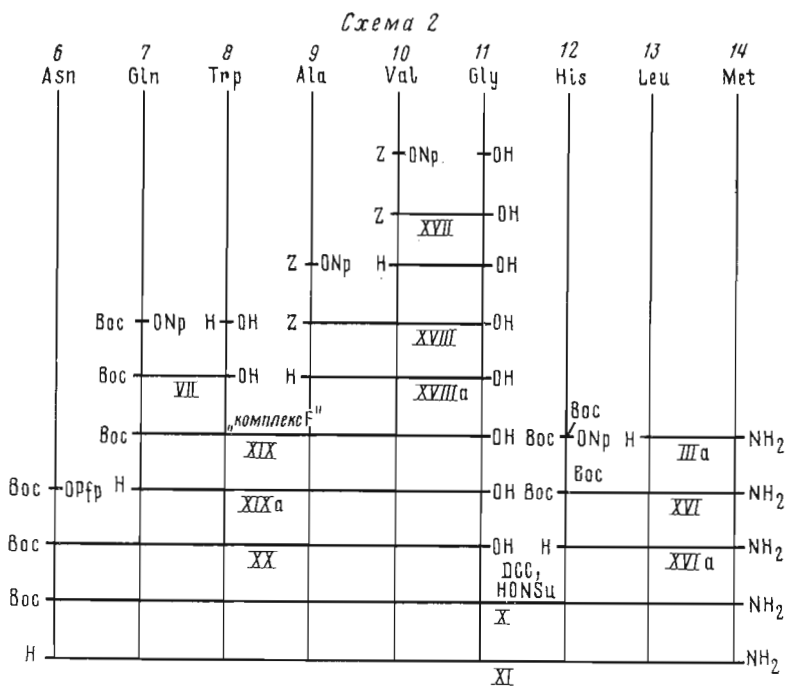


Рис. 2. Хроматографическая очистка бомбезин-(6-14)-пептида (XI), полученного по схеме 6+3: *a* — ионообменная хроматография на колонке (1,3×23 см) с SP-сефадексом С-25 (условия см. рис. 1а); заштрихована выделяемая фракция. *б* — анализ выделенной фракции аналитической ВЭЖХ, условия те же, что на рис. 1б

(XI) в аналитически чистом виде (рис. 1) с выходом 64%. Поскольку при конденсации фрагментов (IX) и (Va), (IV) и (IIIa) С-концевыми аминокислотами были валин и гистидин соответственно, нельзя было исключить возможность их частичной рацемизации. Для доказательства оптической чистоты остатков His и Val был осуществлен синтез нонапептида (XI) по альтернативной схеме 6+3 конденсацией фрагментов 6-11 (XX) и 12-14 (XVIa) (схема 2). При этом С-концевой аминокислотой карбоксильного компонента в одном случае являлся глицин, а в другом гистидин вводился в синтез в виде *n*-нитрофенилового эфира N^{α} , N^{im} -ди-*трет*-бутилоксикарбонильного производного. После деблокирования продукта конденсации и очистки хроматографией на SP-сефадексе С-25 был выделен с выходом 39% аналитически чистый, по данным ВЭЖХ (рис. 2), препарат нонапептида (XI). Однако синтез по этой схеме затруднен из-за плохой растворимости как пента- (XIX), так и гексапептида (XX). Возможно, именно это является причиной более низкого выхода нонапептида при синтезе по схеме 6+3.



Химические сдвиги (δ , м. д.) протонов и КССВ бомбезин-(6-14)-пептида (XI)
DMSO- d_6 , 30° С

Амино-кислотный остаток	NH	C α H	C β H	Другие протоны	$^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$, Гц
Asn	—	3,45	2,28; 2,46		
Gln	8,13	4,16	1,68; 1,84	C γ H ₂ 2,05	
Trp	8,17	4,51	3,16; 2,98	C2-H 7,15; C4-H 7,60; C5-H 6,97; C6-H 7,05; C7-H 7,31; NH 10,78	8,0
Ala	8,07	4,38	1,24		7,2
Val	7,69	4,19	2,01	C γ H ₃ 0,84; 0,86	9,0
Gly	8,22	3,73			11,0*
His	8,04	4,44	2,89	C2-H 7,54; C4-H 6,85	7,2
Leu	8,06	4,16	1,50	C γ H 1,50; C δ H ₃ 0,80; 0,86	7,2
Met	8,38	4,27	1,87; 1,96	C γ H ₂ 2,42; S-CH ₃ 2,01	—
				Протоны амидов боковых цепей и С-концевого амида: 7,43; 7,17; 7,09; 7,06; 6,91; 6,73	

* Указана сумма констант $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$.

Таблица 2

Химические сдвиги (δ , м. д.) и КССВ бомбезин-(1-5)-пептида (XV) и ализезин-(1-5)-пептида (XXII)*
DMSO- d_6 , 23° С

Соединение	Амино-кислотный остаток	NH	C α H	C β H	Другие протоны	$^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$, Гц
(XV)	Glp ¹	7,79	4,06	1,90; 2,22	C γ H ₂ 2,08	0
	Gln ²	8,14	4,25	1,70; 1,87	C γ H ₂ 2,08; NH ₂ 6,76; 7,23	8,0
	Arg ³	8,46	4,28	1,60; 1,90	C γ H ₂ 1,53; C δ H ₂ 2,99; 3,10; N ϵ H 9,28	8,8
	Leu ⁴	7,98	4,22	1,46	C γ H 1,57; C δ H ₃ 0,79; 0,85	7,5
(XXII)	Gly ⁵	7,35	3,31; 3,38			8,8**
	Glp ¹	7,82	4,06	1,90; 2,25	C γ H ₂ 2,10	0
	Gly ²	8,23	3,70; 3,80			11,5**
	Arg ³	8,38	4,34	1,60; 1,90	C γ H ₂ 1,50; C δ H ₂ 3,02; 3,10; N ϵ H 8,88	8,4
	Leu ⁴	7,99	4,24	1,5-1,6	C γ H 1,5-1,6; C δ H ₃ 0,81; 0,87	7,5
	Gly ⁵	7,50	3,40	3,47		9,3**

* Соединения (XV) и (XXII) характеризуются внутримолекулярной поперечной связью между гуанидиновой группой Arg³ и карбоксильной группой Gly⁵, на что указывает неэквивалентность химических сдвигов протонов у С β -атома Arg и нулевой температурный коэффициент N ϵ H-протона Arg.** Указана сумма констант $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$.

Сравнение физико-химических характеристик препаратов нонапептида (XI), полученных по схемам 5+4 и 6+3 (см. «Экспериментальную часть»), — величин коэффициентов емкости, значений R_f в различных системах растворителей, электрофоретической подвижности, величин удельного вращения — указывает на их идентичность. Кроме того, стереоспецифическое окисление гидролизатов препаратов нонапептида (XI) оксидазой *L*-аминокислот из яда гремучей змеи *Crotalis adamanteus*, согласно методике [18], показало отсутствие *D*-валина. Однако гистидин в этих условиях не окисляется.

Данные спектров ¹H-ЯМР и гомоядерной двумерной спектроскопии (табл. 1) нонапептида (XI), полученного по двум разным схемам, также идентичны. Согласно литературным данным, амидные протоны наиболее чувствительны к структурным изменениям, в том числе и к рацемизации отдельных аминокислотных остатков в пептиде, поскольку в этом случае

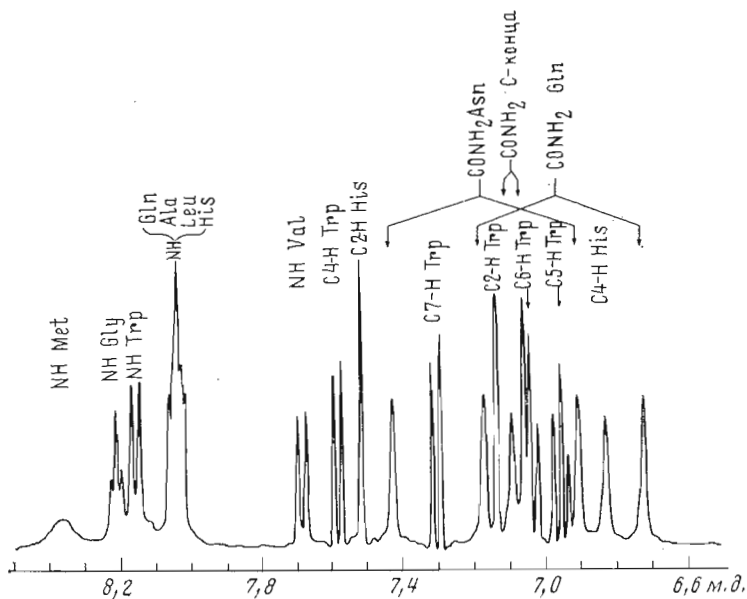


Рис. 3. Фрагмент ^1H -ЯМР-спектра (360 МГц) бомбезин-(6–14)-пептида (XI), синтезированного по схеме 5+4

образуется смесь диастереомеров, химические сдвиги протонов которых сильно различаются. Спектры ^1H -ЯМР пептидов, включающих ароматические остатки, особенно чувствительны к наличию диастереомеров ввиду сильного анизотропного влияния ароматических циклов [19]. На рис. 3 приведена слабополярная часть ^1H -ЯМР-спектра (360 МГц) нонапептида (XI), синтезированного по схеме 5+4. В нем не наблюдается даже признаков лишних сигналов, которые могли бы свидетельствовать о рацемизации гистидина или валина. Из этого следует, что оба препарата нонапептида (XI), полученные по схемам 1 и 2, не содержат примеси диастереомеров и являются оптически чистыми соединениями.

N-Концевой бомбезин-(1–5)-пептид (XV) получили последовательным наращиванием аминокислотной цепи (схема 1) методом активированных эфиров. После деблокирования трипептида (XIII) каталитическим гидрогенолизом синтез велся без защиты гуанидиновой группы аргинина. Контроль за чистотой пентапептида (XV) осуществляли с помощью ТСХ и аналитической ВЭЖХ (рис. 4). Структура бомбезин-(1–5)-пептида (XV) подтверждена данными ^1H -ЯМР-спектроскопии высокого разрешения (360 МГц) (табл. 2).

Конденсация фрагментов 1–5 (XV) и 6–14 (XI) проводилась двумя методами: карбодимидным в присутствии N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбонимида и методом смешанных ангидридов, где роль основания выполняла гуанидиновая группа аргинина. Из-за низкой растворимости фрагмента 1–5 (XV) в диметилформамиде реакцию активации с изобутилхлорформиаом начинали в суспензионном виде и проводили в течение 10 мин до полной гомогенности раствора. Выделенные препараты бомбезина (I) очищали хроматографией на SP-сефадексе С-25 в градиенте пиридин-ацетатного буфера с последующей распределительной хроматографией на сефадексе G-25 и препаративной ВЭЖХ. В результате оба препарата бомбезина (I), синтезированные вышеуказанными способами, были получены в аналитически чистом виде (рис. 5а) с выходом 25%.

Структура бомбезина подтверждена данными ^1H -ЯМР-спектроскопии (360 МГц). Отнесение резонансных сигналов проведено методом двумерной корреляционной спектроскопии (COSY) ЯМР [20]. Спин-спиновые взаимодействия между протонами каждого аминокислотного остатка, а также между протонами пептидных связей проявляются в COSY-спект-

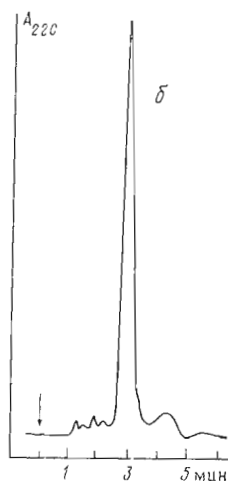
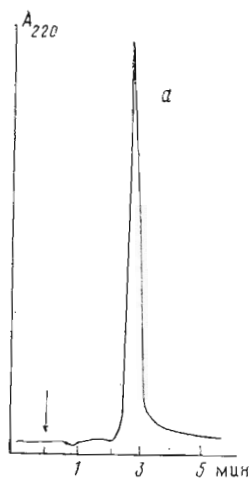


Рис. 4

Рис. 4. Аналитическая ВЭЖХ бомбезин-(1-5)-пептида (XV) (а) и ализезин-(1-5)-пептида (XXII) (б). Колонка (0,46×25 см) Zorbax C₈, элюент: 5% CH₃CN – 95% 0,2 М CH₃COONH₄, скорость элюции 2 мл/мин, детекция при 220 нм

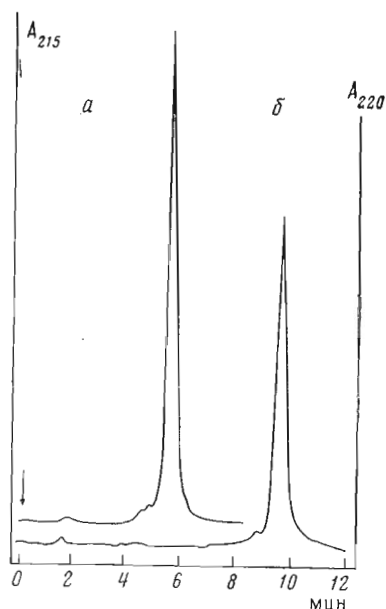


Рис. 5

Рис. 5. Аналитическая ВЭЖХ (после preparативной ВЭЖХ): а – бомбезина (I) на колонке (0,46×25 см) Zorbax ODS, элюент: 25% CH₃CN – 75% 0,2 М CH₃COONH₄, скорость элюции 1,6 мл/мин, детекция при 215 нм. Условия preparативной ВЭЖХ: колонка (2,12×25 см) Zorbax C₈, элюент: 23% CH₃CN – 77% 0,2 М CH₃COONH₄, скорость элюции 20 мл/мин, детекция при 215 нм; б – ализезина (XXV) на колонке (0,46×25 см) Zorbax ODS, элюент: 22% CH₃CN – 78% 0,2 М CH₃COONH₄, скорость элюции 1,6 мл/мин, детекция при 220 нм. Условия preparативной ВЭЖХ: колонка (2,12×25 см) Zorbax ODS, элюент: 23% CH₃CN – 77% 0,2 М CH₃COONH₄, скорость элюции 20 мл/мин, детекция при 220 нм

ре в виде кросс-пиков. Анализ COSY-спектров указанных соединений показал, что, исходя из предполагаемых аминокислотных остатков, число кросс-пиков соответствует ожидаемому количеству. Результаты отнесения приведены в табл. 3.

Синтез ализезина (XXV) выполнен по схеме 5+(5+4) аналогично синтезу бомбезина. Конденсацию блоков последовательности 1–5 (Glp-Gly-Arg-Leu-Gly) (XXII) и 6–14 (Thr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) (XXIVa) осуществляли методом смешанных ангидридов с помощью изобутилхлорформата. Полученный продукт был очищен хроматографией на SE-сефадексе С-25 и затем ВЭЖХ, в результате чего был выделен с выходом 35% индивидуальный препарат ализезина (XXV) (рис. 5б).

Влияние полученных нами пептидов бомбезина, бомбезин-(1-5)-пептида, бомбезин-(6-14)-пептида, ализезин-(1-5)-пептида, ализезин-(6-14)-пептида на терморегуляцию было изучено А. Т. Марьяновичем с соавт. [21] в опытах на кроликах. Препарат вводили в боковой желудочек мозга в изотоническом растворе хлористого натрия. Контрольным животным вводили только изотонический раствор. Кроликов помещали в климатическую камеру Feutron с температурой 10° С. Обнаружено, что бомбезин и бомбезин-(6-14)-пептид в дозе 1 мкг/кг вызывают за 1 ч снижение ректальной температуры приблизительно на 2° С. Близкий по величине эффект проявляли ализезин и ализезин-(6-14)-пептид. В контрольной группе статистически значимого снижения температуры не обнаружено. N-Концевые пентапептиды бомбезина (XV) и ализезина (XXII) влияния на терморегуляцию не оказывали. Тот же результат получен и при увеличении дозы этих пентапептидов до 100 мкг/кг. По-

Химические сдвиги (δ , м. д.) протонов бомбезина
DMSO- d_6 , 30° С

Амино- кислотный остаток	NH	C $^{\alpha}$ H	C $^{\beta}$ H	Другие протоны
Glp ¹	7,78	4,11	1,88; 2,01	
Gln ²	8,19	4,26	1,82; 1,82	
Arg ³	8,05	4,30	1,61; 1,72	C $^{\beta}$ H 1,50; 1,50; C $^{\delta}$ H 3,12; 3,12; N $^{\epsilon}$ H 7,56
Leu ⁴	8,01	4,32	1,49; 1,49	
Gly ⁵	8,16	3,69; 3,79		
Asn ⁶	8,09	4,59	2,46; 2,59	
Gln ⁷	8,26	4,09	1,85; 1,71	
Trp ⁸	8,07	4,47	3,01; 3,14	C2-H 7,16; C4-H 7,77; C5-H 6,97; C6-H 7,03; C7-H 7,32; NH 10,78
Ala ⁹	7,88	4,34	1,23	
Val ¹⁰	7,59	4,11	1,93	C $^{\beta}$ H 0,86; 0,86
Gly ¹¹	8,21	3,74; 3,74		
His ¹²	8,12	4,63	2,98; 3,11	C2-H 8,98; C4-H 7,33
Leu ¹³	8,19	4,23	1,52; 1,52	
Met ¹⁴	8,06	4,29	1,91; 1,91	C $^{\beta}$ H 2,43; 2,43; S-CH ₃ 2,03

Примечание. Химические сдвиги амидных протонов CONH₂ остатков Gln², Asn⁶, Gln⁷ и C-концевого амида: 7,53; 7,03 (Gln²); 7,26; 7,04 (Asn⁶); 7,26; 6,75 (Gln⁷); 7,16; 6,75 (C-конц.) и протонов C $^{\beta}$ H остатков Leu: 0,89; 0,82; C $^{\gamma}$ H остатков Leu: 1,61. Слабополярные химические сдвиги протонов не удалось отнести к конкретным остаткам из-за перекрытия сигналов. По этой же причине не отнесены C $^{\gamma}$ H-протоны остатков Glp¹, Gln², Gln⁷. Отнесение выполнено с помощью методов двумерной спектроскопии ЯМР COSY и NOESY.

видимому, N-концевые пентапептиды бомбезина и алитезина играют особую роль в регуляции других функций.

Одновременно П. К. Якимов с соавт. [22] при исследовании влияния синтезированных нами пептидов на секрецию поджелудочной железы показали, что внутривенное введение бомбезина в дозе 1 мкг/кг стимулирует секреторную функцию поджелудочной железы собаки в течение 2 ч, что сопоставимо с секреторной, вызываемой при скармливании 100 г мяса. Бомбезин-(6—14)-пептид (XI) стимулирует секрецию поджелудочной железы только в течение 1-го ч после введения, тогда как N $^{\alpha}$ -Вос-защищенный пептид (X) стимулирует секрецию сильнее и более длительно — до 3 ч.

Алитезин при длительной инфузии в дозе 1 мкг/кг за 1 ч вызывает секрецию поджелудочной железы в 5 раз слабее, чем та же доза бомбезина. Таким образом, замена в молекуле бомбезина во 2-м положении глутамина на глицин и в 6-м положении аспарагина на треонин приводит к изменению влияния на секреторную функцию поджелудочной железы. N-Концевые пентапептиды бомбезина и алитезина существенно не влияют на секреторную функцию поджелудочной железы [22].

Авторы статьи выражают глубокую благодарность акад. АН ЛатвССР Г. И. Чипенсу и проф. В. Ф. Мартынову за полезные советы и интерес, проявленный к настоящему исследованию, а также Ж. Д. Беспаловой (ВКНЦ АМН СССР) за предоставленный для сравнения препарат бомбезина.

Экспериментальная часть

Для синтеза использовались L-аминокислоты (Reanal, Венгрия). Необходимые производные были приготовлены по известным методикам [23, 24]. Температуры плавления определены на приборе Кофлера и приведены без корректирования. Индивидуальность полученных соединений проверяли с помощью ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ). Проявление пластинок — хлор-бензидиновым методом. Приведены хроматографические подвижности в следующих системах: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 3 : 1 : 1 (А), *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 30 : 20 : 6 : 24 (Б); *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 10,5 : 1 : 6 : 7,5 (В); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 30 : 20 : 6 : 11 (Г); бензол —

ацетон, 1:1 (Д); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 8:3:0,5 (Е); *n*-бутанол — 1% уксусная кислота — пиридин, 5:11:3 (верхняя фаза) (Ж); этилацетат (З); *n*-бутанол — изопропанол — 1 н. NH₄OH — этилацетат, 1:1:2,5:1 (верхняя фаза) (И); бензол — ацетон — уксусная кислота, 50:25:1 (К); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 60:20:6:11 (Л); *втор*-бутанол — 0,1 М уксусная кислота, 1:1 (верхняя фаза) (М); хлороформ — метанол — 25% NH₄OH, 5:3:1 (Н). Электрофоретическая подвижность определена по отношению к гистидину (E_{His}) на бумаге FN-12 (Filtrak, ГДР) при градиенте потенциала 30 В·см⁻¹ в 2% уксусной кислоте (рН 2,6). Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных в запаянных ампулах 6 н. HCl при 110°С в течение 20 ч, выполняли на анализаторе LKB 4102 (Швеция). Элементный анализ проводили на автоматическом С,Н,N-анализаторе 185 В Hewlett Packard. Удельное вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer 141. ВЭЖХ выполняли на жидкостном хроматографе Du Pont 830 (США). Ионообменную хроматографию проводили на SP-сефадексе С-25 в пиридин-ацетатном буфере (рН 5,2) в градиентном режиме в интервале молярности буфера от 0,05 до 1,0 и на CM-сефадексе в системе метанол — вода (7:3) (колонка 1,3×23 см, скорость элюирования 30 мл/ч, детекция при 280 нм). Линейный градиент создавали с помощью градиентного смесителя объемом 500 мл. В качестве детектирующего прибора использовали Uvicord II (LKB, Швеция). Для колоночной хроматографии использовали колонку (2,5×50 см) с силикагелем Silpearl (ЧССР) или Woelm (ФРГ), скорость элюирования 30 мл/ч.

Спектры ¹H-ЯМР получены на спектрометре WM-360 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 360 МГц. Химические сдвиги определены относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана с точностью ±0,01 м.д., а константы спин-спинового взаимодействия (KCCB) — с точностью ±0,4 Гц. Двумерные COSY-спектры получены с помощью последовательности неселективных 90-градусных импульсов [25]: (90°-t₁-90°-t₂)_n для 512 эквидистантных значений t₁ с шагом 0,1 мс и числом накоплений n=48. Задержка между сериями импульсов 1,5 с. Преобразование Фурье COSY-спектров выполнено с помощью программы Bruker FTNMR 2D, версия 810515.6.

Вос-Leu-Met-OH-DCHA (II). К раствору 2,0 г (13,4 ммоль) метионина в 13,4 мл 1 н. NaOH прибавляли 5,2 г (14,8 ммоль) Вос-Leu-ONp в диоксане. Реакционную смесь выдерживали 48 ч, а затем упаривали до небольшого объема, разбавляли водой, экстрагировали этилацетатом. Водный слой подкисляли 1 н. H₂SO₄ и выпавшее масло экстрагировали (3×40 мл) этилацетатом, объединенный экстракт промывали водой, сушили над Na₂SO₄ и упаривали. Маслянистый остаток растворяли в 25 мл эфира и добавляли 2,7 мл (13,4 ммоль) дициклогексилamina. Осадок отфильтровывали, сушили над P₂O₅. После перекристаллизации из этилацетата получали 5,8 г (80%) соединения (II), т. пл. 152–154°С, R_f 0,82 (Б). Найдено, %: С 61,17, Н 9,83, N 7,55. C₂₈H₅₃N₃O₅S·½H₂O. Вычислено, %: С 60,83, Н 9,84, N 7,60.

Вос-Leu-Met-NH₂ (III). 5,0 г (9,2 ммоль) вещества (II) суспендировали в 50 мл этилацетата, промывали 2% H₂SO₄ водой, высушивали Na₂SO₄ и упаривали. Остаток растворяли в 2 мл метанола, добавляли эфирный раствор диазометана (9,4 ммоль в расчете на нитрозометилмочевину) и выдерживали 5 мин. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 3 мл метанола и прибавляли 100 мл раствора аммиака в метаноле. Реакционную смесь выдерживали 3 сут, упаривали, остаток кристаллизовали под гексаном и перекристаллизовывали из этилацетата. Получали 3,2 г (97%) соединения (III), т. пл. 156–158°С (ср.: 158–159°С [26]). R_f 0,55 (З). [α]_D²⁰ -31,6° (с 1, DMF). Найдено, %: С 51,85, Н 8,70, N 10,95. C₁₆H₃₁O₄N₃S·½H₂O. Вычислено, %: С 51,86, Н 8,70, N 11,34.

Вос-Gly-His-OH (IV). К раствору 2,0 г (12,9 ммоль) гистидина в 12,9 мл 1 н. NaOH прибавляли 4,2 г (14,2 ммоль) Вос-Gly-ONp в диоксане. Реакционную смесь выдерживали 48 ч, а затем упаривали до небольшого объема, разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Водный слой

подкисляли 12,9 мл (12,9 ммоль) 1 н. HCl, упаривали и остаток хроматографировали на CM-сефадексе С-25. После упаривания и переосаждения из изопропанола эфиром получали 3,9 г (97%) соединения (IV), т. пл. 128–130° С (с разл.), R_f 0,30 (А). Найдено, %: С 47,35, Н 6,53, N 17,02. $C_{13}H_{20}N_2O_5 \cdot H_2O$. Вычислено, %: С 47,27, Н 6,71, N 16,96.

Boc-Gly-His-Leu-Met-NH₂ (V). К раствору 1,1 г (3,6 ммоль) дипептида (IV) в смеси 24 мл диоксана и 8 мл DMF прибавляли при –5° С и перемешивали 2,7 г (3,6 ммоль) «комплекса F» [27]. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при –5° С и 30 мин при комнатной температуре и отфильтровывали от N,N'-дициклогексилмочевины раствор пентафторфенилового эфира дипептида (IV). 1,3 г (3,6 ммоль) дипептида (III) растворяли в 1 мл ледяной уксусной кислоты и прибавляли 0,1 мл 2-меркаптоэтанола, 0,1 мл диметилсульфида и 5,7 мл (12,6 ммоль) 2,2 н. раствора хлористого водорода в ледяной уксусной кислоте. Выдерживали 20 мин, после чего растворитель упаривали, остаток обрабатывали эфиром, отфильтровывали, сушили и обрабатывали горячим изопропанолом. Получали 1,1 г (99%) соединения (IIIa), R_f 0,38 (А), E_{DMS} 0,86. 1,1 г (3,6 ммоль) гидрохлорида (IIIa) растворяли в 3 мл DMF, добавляли при 0° С 0,45 мл (3,6 ммоль) N-этилморфолина и полученный ранее раствор *Boc-Gly-His-OPfp*. Реакционную смесь выдерживали 24 ч, упаривали до небольшого объема, растворяли в 20 мл *n*-бутанола, насыщенного водой, и промывали 2% уксусной кислотой, водой, 5% NaHCO₃ и опять водой. После двукратной обработки горячим этилацетатом получали 1,2 г (58%) соединения (V), т. пл. 164–167° С, R_f 0,34 (А). Найдено, %: С 51,14, Н 7,58, N 17,53. $C_{21}H_{31}N_7O_6S \cdot \frac{1}{2}H_2O$. Вычислено, %: С 51,04, Н 7,50, N 17,36. Аминокислотный анализ: Gly 1,09 (1), His 0,96 (1), Leu 1,00 (1), Met 0,93 (1).

Z-Ala-Val-OH (VI). К раствору 2,0 г (17,2 ммоль) валина в 17,2 мл 1 н. NaOH прибавляли 6,5 г (18,8 ммоль) *Z*-Ala-ONp в диоксане. Реакционную смесь выдерживали 48 ч, упаривали до небольшого объема, разбавляли водой, экстрагировали этилацетатом. Водный слой подкисляли 1 н. H₂SO₄ и выпавшее масло экстрагировали этилацетатом (3×30 мл), экстракт промывали водой до нейтральной реакции, сушили, упаривали и остаток закристаллизовывали под гексаном. Получали 5,1 г (94%) соединения (VI), т. пл. 142–144° С, R_f 0,66 (Д). Найдено, %: С 59,43, Н 6,94, N 8,41. $C_{16}H_{22}N_2O_5$. Вычислено, %: С 59,62, Н 6,88, N 8,69.

Boc-Gln-Trp-OH (VII). Аналогично пептиду (II) из 2,0 г (9,8 ммоль) триптофана и 3,9 г (10,8 ммоль) *Boc*-Gln-ONp после перекристаллизации из смеси изопропанол – гексан с выходом 3,6 г (86%) получали дипептид (VII). Т. пл. 173–175° С (с разл.), R_f 0,66 (Е). Найдено, %: С 58,17, Н 6,65, N 12,80. $C_{21}H_{28}N_4O_6$. Вычислено, %: С 58,32, Н 6,52, N 12,95.

Boc-Gln-Trp-Ala-Val-OH (VIII). 2,6 г (6,0 ммоль) дипептида (VII) растворяли в смеси 45 мл диоксана и 15 мл DMF, охлаждали до 0° С и при интенсивном перемешивании прибавляли 4,6 г (6,0 ммоль) «комплекса F». Перемешивали 30 мин при 0° С, а затем 1 ч при комнатной температуре.

1,9 г (6,0 ммоль) дипептида (VI) растворяли в 100 мл метанола и гидрировали на 10% Pd/C. Выпавший свободный пептид растворяли добавлением 6 мл (6,0 ммоль) 1 н. NaOH, катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали и к полученному остатку прибавляли раствор пентафторфенилового эфира дипептида (VII) в диоксане. Реакционную смесь выдерживали 24 ч, после чего в условиях выделения пептида (VI) получали после двукратной обработки горячим этилацетатом 2,7 г (75%) соединения (VIII), т. пл. 164–166° С, R_f 0,85 (А). Найдено, %: С 56,30, Н 7,23, N 13,42. $C_{29}H_{42}N_6O_8 \cdot H_2O$. Вычислено, %: С 56,12, Н 7,14, N 13,53.

Boc-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-OH (IX). 2,0 г (3,3 ммоль) тетрапептида (VIII) деблокировали действием 5,8 мл (11,6 ммоль) 2,2 н. раствора хлористого водорода в ледяной уксусной кислоте в присутствии 0,1 мл 2-меркаптоэтанола и 0,1 мл диметилсульфида. Через 30 мин раствор упаривали, остаток переосаждали из смеси изопропанол – эфир, отфильтровывали и сушили над КОН. Гидрохлорид (VIIIa) растворяли в 5 мл DMF, охлаждали до 0° С и последовательно прибавляли 0,89 мл (6,6 ммоль) N-этилмор-

фолина и 1,6 г (3,9 ммоль) Boc-Asn-OPfp. Реакционную смесь выдерживали 24 ч, после чего в условиях выделения пептида (IV) получали пентапептид (IX), который хроматографировали на колонке с силикагелем Woelm в системе растворителей (E). Выход пентапептида (IX) 1,6 г (67%), т. пл. 149–152°С (с разл.), R_f 0,48 (A), 0,64 (E). Найдено, %: С 51,41, Н 6,83, N 15,53. $C_{33}H_{45}N_8O_{10} \cdot H_2O$. Вычислено, %: С 51,61, Н 6,80, N 15,43. Аминокислотный анализ: Asp 1,07 (1), Glu 1,05 (1), Ala 1,00 (1), Val 0,98 (1).

Boc-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂ (X) (схема I). 0,60 г (1,1 ммоль) тетрапептида (V) деблокировали действием 2,7 мл (3,8 ммоль) 2 н. раствора хлористого водорода в ледяной уксусной кислоте в присутствии 0,1 мл 2-меркаптоэтанола и 0,1 мл диметилсульфида в течение 40 мин, после чего растворитель упаривали и вещество перекристаллизовывали из изопропанола. Получали 0,55 г (98%) соединения (Va), E_{1115} 1,02.

Дигидрохлорид тетрапептида (Va) растворяли в 5 мл DMF, раствор охлаждали до -5°С и последовательно добавляли 0,27 мл (2,2 ммоль) N-этилморфолина, 0,77 г (1,1 ммоль) пентапептида (IX), 0,14 г (1,2 ммоль) N-гидроксисукцинимид и охлажденный раствор 0,23 г (1,1 ммоль) DCC в 3 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при -5°С и 48 ч при комнатной температуре. Затем отфильтровывали N,N'-дихлорогексильмочевину, реакционную смесь упаривали, вещество экстрагировали *n*-бутанолом (3×30 мл), экстракт промывали водой, упаривали, вещество перекристаллизовывали из смеси метанол-изопропанол. Получали 0,63 г вещества (X), выход сырого продукта 69%, R_f (основного пятна) 0,54 (A). 0,30 г продукта очищали методом адсорбционной хроматографии на колонке (1×55 см) с силикагелем Silpearl (колоночный) в системе А. Скорость элюирования 15 мл/ч, объем фракции 2 мл. Получали 0,11 г (36%) соединения (X), R_f 0,54 (A), 0,51 (Г). Аминокислотный анализ: Asp 1,02 (1), Glu 1,04 (1), Gly 1,00 (1), Ala 1,01 (1), Val 1,00 (1), Met 0,94 (1), Leu 0,98 (1), His 0,97 (1).

Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂ (XI). 0,130 г соединения (X) растворяли в 1 мл ледяной уксусной кислоты, добавляли 0,1 мл 2-меркаптоэтанола, 0,1 мл диметилсульфида и 0,23 мл 2 н. раствора хлористого водорода в ледяной уксусной кислоте. Через 40 мин смесь упаривали, вещество обрабатывали эфиром, отфильтровывали и высушивали над P₂O₅ и KOH. 0,110 г деблокированного нонапептида очищали методом ионообменной хроматографии на SP-сефадексе С-25 (рис. 1а). Получали 0,087 г (79%) соединения (XI). 0,015 г вещества (XI) очищали методом препаративной ВЭЖХ (условия см. рис. 1в). Получали 0,012 г (80%) вещества (XI). R_f 0,60 (B), 0,56 (Г), 0,64 (B). E_{1115} 0,72, $[\alpha]_D^{25}$ -48,7° (с 1, 1% CH₃COOH), k' 3,62. Аминокислотный анализ: Asp 1,07 (1), Glu 1,12 (1), Gly 1,09 (1), Ala 1,06 (1), Met 1,00 (1), Leu 1,01 (1), Val 1,00 (1), His 1,03 (1).

Z-Leu-Gly-OH (XII). Из 1,0 г (13,3 ммоль) глицина, 13,3 мл 1 н. NaOH и 5,7 г (14,6 ммоль) Z-Leu-ONp в 25 мл диоксана получали дипептид (XII) с выходом 3,9 г (92%) после перекристаллизации из смеси этилацетата и гексана. Т. пл. 114–116°С, R_f 0,79 (A). Найдено, %: С 58,32, Н 6,90, N 8,32. $C_{16}H_{22}N_2O_5 \cdot \frac{1}{2}H_2O$. Вычислено, %: С 58,00, Н 7,00, N 8,45.

Z-Arg(Z₂)-Leu-Gly-OH (XIII). 2,0 г (6,2 ммоль) вещества (XII) гидрировали в метаноле на 10% Pd/C. Катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали, к остатку прибавляли 6,2 мл 1 н. NaOH и 5,1 г (6,8 ммоль) Z-Arg(Z₂)-OPfp в 15 мл диоксана. Через сутки к реакционной смеси добавляли 20 мл 2% H₂SO₄, осадок отфильтровывали, промывали водой, высушивали и кристаллизовали из изопропанола. Получали 4,1 г (89%) вещества (XIII), т. пл. 176–178°С, R_f 0,57 (K). Найдено, %: С 60,07, Н 6,28, N 11,56. $C_{38}H_{46}N_6O_{10} \cdot \frac{1}{2}H_2O$. Вычислено, %: С 60,39, Н 6,27, N 11,12.

Boc-Gln-Arg-Leu-Gly-OH (XIV). 2,5 г (3,4 ммоль) вещества (XIII) гидрировали в смеси метанол-уксусная кислота (1:1) на Pd-черни. Катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали, остаток осажда-

ли из метанола эфиром и высушивали над КОН. Полученный деблокированный пептид (XIIIa) растворяли в 10 мл DMF, прибавляли 1,4 г (3,7 ммоль) Boc-Gln-ONp и перемешивали 48 ч. Затем продукт реакции осаждали этилацетатом, отфильтровывали и высушивали. 1,6 г продукта очищали методом ионообменной хроматографии на CM-сефадексе С-25. Получали 1,5 г (78%) вещества (XIV), т. пл. 189–191° С, R_f 0,26 (А), 0,51 (В). Найдено, %: С 47,74, Н 7,61, N 18,37. $C_{22}H_{44}N_8O_8 \cdot 2H_2O$. Вычислено, %: С 47,35, Н 7,95, N 19,41.

Glp-Gln-Arg-Leu-Gly-OH (XV). 1,2 г (2,1 ммоль) вещества (XIV) деблокировали действием 4,3 мл (7,4 ммоль) 2 н. раствора хлористого водорода в ледяной уксусной кислоте в течение 20 мин, затем растворитель упаривали, остаток обрабатывали эфиром, отфильтровывали, растворяли в воде и обрабатывали дауксом 1×8 (ОН⁻) до отрицательной реакции на ион хлора. Воду упаривали, остаток растворяли в 10 мл DMF и прибавляли 1,4 г (4,2 ммоль) Glp-OPr. Через сутки растворитель упаривали, остаток обрабатывали горячим изопропанолом и кристаллизовали из DMF. Получали 1,1 г (79%) соединения (XV), R_f 0,39 (Б), 0,36 (В), 0,32 (Г). E_{vis} 0,59, k' 1,16 (рис. 4a). Найдено, %: С 46,48, Н 6,90, N 20,16. $C_{24}H_{40}N_9O_8 \cdot 2H_2O$. Вычислено, %: С 46,60, Н 7,17, N 20,37. Аминокислотный анализ: Glu 2,14 (2), Arg 0,97 (1), Leu 1,00 (1), Gly 1,04 (1).

Boc-His(Boc)-Leu-Met-NH₂ (XVI). 1,6 г (5,4 ммоль) гидрохлорида (IIIa) растворяли в 3 мл DMF, добавляли 0,7 мл (5,4 ммоль) N-этилморфолина и 2,9 г (6,1 ммоль) Boc-His(Boc)-ONp. Реакционную смесь выдерживали 24 ч, упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали водой. Этилацетатный раствор высушивали, упаривали, вещество перекристаллизовывали из смеси изопропанол – эфир и изопропанол – гексан. Получали 1,8 г (55%) соединения (XVI), т. пл. 116–118° С, R_f 0,85 (А). Найдено, %: С 54,01, Н 7,75, N 14,04. $C_{27}H_{46}N_6O_7$. Вычислено, %: С 54,16, Н 7,74, N 14,04.

Z-Val-Gly-OH (XVII). Получали из 1,0 г (43,3 ммоль) глицина, 13,3 мл 1 н. NaOH и 5,5 г (14,6 ммоль) Z-Val-ONp аналогично веществу (II). Выход 3,6 г (88%) после перекристаллизации из смеси изопропанол – гексан, т. пл. 145–146° С, R_f 0,29 (А), 0,65 (Б). Найдено, %: С 58,76, Н 6,69, N 9,04. $C_{15}H_{26}N_2O_5$. Вычислено, %: С 58,43, Н 6,54, N 9,09.

Z-Ala-Val-Gly-OH (XVIII). 3,0 г (9,7 ммоль) дипептида (XVII) гидрировали 5 ч в метаноле на 10% Pd/C, после чего катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали, остаток растворяли в 9,7 мл 1 н. NaOH и к нему приливали раствор 3,7 г (10,7 ммоль) Z-Ala-ONp в диоксане. Реакционную смесь выдерживали 48 ч и обрабатывали как при получении соединения (II). При этом при подкислении водного слоя 0,5 н. H₂SO₄ выпадал продукт, который промывали водой, высушивали и перекристаллизовывали из смеси изопропанол – гексан. Получали 2,8 г (76%) соединения (XVIII), т. пл. 210–213° С, R_f 0,90 (А). Найдено, %: С 55,92, Н 6,51, N 10,82. $C_{18}H_{25}N_3O_6 \cdot \frac{1}{2}H_2O$. Вычислено, %: С 55,66, Н 6,75, N 10,82.

Boc-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-OH (XIX). 2,2 г (5,8 ммоль) трипептида (XVIII) гидрировали 2 ч в метаноле на 10% Pd/C. Выпавший свободный трипептид (XVIIIa) растворяли добавленным 5,8 мл (5,5 ммоль) 1 н. NaOH. Катализатор отфильтровывали, упаривали растворитель. 2,7 г (6,4 ммоль) дипептида (VII) растворяли в смеси 30 мл диоксана и 10 мл DMF и при охлаждении до 0° С прибавляли 4,8 г (6,4 ммоль) «комплекса F». Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 0° С и 1 ч при комнатной температуре. Полученный пентафторфениловый эфир дипептида (VII) прибавляли к натриевой соли вещества (XVIIIa) и реакционную смесь выдерживали 12 ч. Далее обрабатывали как при получении соединения (XVI). После двукратной обработки горячим метанолом получили 2,4 г (62%) соединения (XIX), т. пл. 248–250° С (с разл.). R_f 0,63 (А). Найдено, %: С 56,52, Н 6,94, N 14,69. $C_{31}H_{45}N_7O_9$. Вычислено, %: С 56,44, Н 6,88, N 14,86.

Boc-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-OH (XX). 1,5 г (2,2 ммоль) соединения (XIX) деблокировали как при получении соединения (V), полученный гидрохлорид (XIXa) растворяли в 3 мл DMF, прибавляли 0,56 мл

(4,4 ммоль) *N*-этилморфолина и 1,0 г (2,6 ммоль) *Boc*-Asn-OPr. Реакционную смесь выдерживали 24 ч и обрабатывали как при получении соединения (XVI). После перекристаллизации из смеси DMF — этилацетат получали 0,81 г (47%) соединения (XX), т. пл. 215—218°С (с разл.), R_f 0,50 (А). Найдено, %: С 54,61, Н 6,58, N 15,92. $C_{35}H_{51}N_9O_{11}$. Вычислено, %: С 54,32, Н 6,64, N 16,29.

Boc-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂ (X) (схема 2). 0,50 г (0,8 ммоль) соединения (XVI) деблокировали в течение 50 мин действием 2,9 мл (5,9 ммоль) 2 н. раствора хлористого водорода в ледяной уксусной кислоте в присутствии 0,1 мл 2-меркаптоэтанола и 0,1 мл диметилсульфида, после чего растворитель упаривали и вещество обрабатывали эфиром и горячим изопропанолом. Получали 0,39 г (88%) дигидрохлорида (XVIa), R_f 0,49 (А), E_{His} 1,04.

0,39 г (0,82 ммоль) дигидрохлорида (XVIa) растворяли в 5 мл DMF, охлаждали до 0°С и прибавляли 2,1 мл (1,6 ммоль) *N*-этилморфолина, 0,65 г (0,84 ммоль) гексапептида (XX) и 0,11 г (0,92 ммоль) *N*-гидрокси-сукцинимида. Смесь охлаждали до -5°С и к ней при перемешивании добавляли охлажденный раствор 0,18 г (0,82 ммоль) DCC в DMF. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0°С и 48 ч при комнатной температуре. Затем отфильтровывали *N,N'*-дициклогексилмочевину, реакционную смесь упаривали до небольшого объема и осаждали вещество этилацетатом. Полученный продукт растворяли в воде, водный раствор экстрагировали *n*-бутанолом (3×30 мл), экстракт промывали водой и 2% уксусной кислотой. После удаления растворителя вещество перекристаллизовывали из смеси метанол — этилацетат. Получали 0,25 г (26%) соединения (X), R_f 0,54 (А), 0,51 (Г). Аминокислотный анализ: Asp 1,01 (1), Glu 1,04 (1), Gly 1,00 (1), Ala 1,02 (1), Val 1,00 (1), Met 0,94 (1), Leu 0,99 (1), His 0,98 (1).

Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂ (XI). 0,22 г соединения (X) деблокировали в течение 40 мин действием 0,33 мл 2 н. раствора хлористого водорода в ледяной уксусной кислоте в присутствии 0,1 мл 2-меркаптоэтанола и 0,1 мл диметилсульфида, после чего растворитель упаривали, остаток обрабатывали эфиром, отфильтровывали, высушивали над P₂O₅ и КОН. 0,183 г деблокированного нонапептида (XI) очищали методом ионообменной хроматографии на SP-сефадексе С-25 (рис. 2). Получали 0,072 г (39%) вещества (XI), R_f 0,60 (В), 0,56 (Г), 0,64 (Б), E_{His} 0,72, $[\alpha]_D^{22}$ -48,8° (с 1, 1% CH₃COOH), k' 3,62. Аминокислотный анализ: Asp 0,98 (1), Glu 1,03 (1), Gly 1,00 (1), Ala 0,97 (1), Val 0,98 (1), Met 0,90 (1), Leu 0,99 (1), His 0,96 (1).

Glp-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂ (бомбезин) (I). 1) 0,115 г (0,2 ммоль) вещества (XV) суспендировали в 5 мл DMF, охлаждали до -10°С и при сильном перемешивании прибавляли 0,026 мл (0,2 ммоль) пзобутилхлорформата. Через 10 мин прибавляли охлажденный до -10°С раствор 0,222 г (0,2 ммоль) нонапептида (XI) и 0,05 мл (0,4 ммоль) *N*-этилморфолина в 3 мл DMF. Перемешивали 15 мин при -10°С, 30 мин при 0°С и затем оставляли при комнатной температуре на 48 ч. Далее вещество осаждали из DMF эфиром, отфильтровывали и высушивали. 0,305 г сырого продукта очищали на колонке (1,3×23 см) с SP-сефадексом С-25 (условия стандартные, см. выше, интервал концентрации буфера 0,05—0,5 М). Для дальнейшей очистки использовали метод распределительной хроматографии на сефадексе G-25 (тонкий) в системе растворителей *n*-бутанол — 1% уксусная кислота — пиридин (5 : 11 : 3) и ВЭЖХ (рис. 5а). Получали 0,072 г (25%) бомбезина (I) с R_f 0,53 (В), 0,40 (Г), 0,55 (Б), E_{His} 0,67, $[\alpha]_D^{22}$ -57,9° (с 1; 1% CH₃COOH), k' 2,11. Аминокислотный анализ: His 1,00 (1), Met 1,01 (1), Val 1,07 (1), Ala 1,09 (1), Gly 2,10 (2), Asp 1,12 (1), Leu 2,15 (2), Arg 1,02 (1), Glu 2,87 (3).

2) 0,12 г (0,2 ммоль) пентапептида (XV) растворяли в смеси 4 мл DMF и 1 мл DMSO, охлаждали до -20°С и последовательно добавляли 0,06 мл (0,2 ммоль) 3 н. раствора хлористого водорода в этилацетате,

0,078 г (0,44 ммоль) N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимида, 0,044 г (0,22 ммоль) DCC и через 30 мин охлажденный до -20°C раствор 0,22 г (0,2 ммоль) бомбезин-(6-14)-пептида (XI) в смеси 4 мл DMF и 1 мл DMSO, к которому было добавлено 0,05 мл (0,4 ммоль) N-этилморфолина. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при -20°C и 48 ч при 3°C . Затем продукт реакции осаждали эфиром. Полученное вещество (0,39 г) хроматографировали на колонке с SP-сефадексом С-25. Выделили 88 мг (26%) бомбезина (I). R_f 0,53 (В), 0,40 (Г), 0,55 (Б), E_{HIS} 0,67, $[\alpha]_D^{22}$ $-57,9^{\circ}$ (c 1; 1% CH_3COOH), k' 2,11.

Z-Gly-Arg-Leu-Gly-OH (XXI). 0,93 г (2,7 ммоль) деблокированного трипептида (XIIIa) растворяли в 10 мл DMF, прибавляли 1,16 г (3,5 ммоль) *Z-Gly-ONp* и перемешивали 24 ч. Затем DMF упаривали, продукт реакции осаждали этилацетатом, осадок отфильтровывали, высушивали, перекристаллизовывали из метанола. Получали 0,61 г (42%) соединения (XXI), т. пл. $215-217^{\circ}\text{C}$, R_f 0,48 (А), 0,26 (Л). Найдено, %: С 53,67, Н 6,89, N 18,02. $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_7$. Вычислено, %: С 53,92, Н 6,60, N 18,34.

Glp-Gly-Arg-Leu-Gly-OH (XXII). 0,55 г (1,0 ммоль) вещества (XXI) гидрировали 11 ч в 10 мл DMF на Pd-черши. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, твердый остаток обрабатывали эфиром, отфильтровывали, высушивали над КОН и P_2O_5 . Полученное вещество (XXIIa) растворяли в 5 мл DMF и прибавляли 0,36 г (1,2 ммоль) *Glp-OPfp*. Через 24 ч продукт реакции осаждали эфиром, отфильтровывали, осадок обрабатывали горячим изопропанолом и кристаллизовали из DMF. Получали 0,4 г (76%) соединения (XXII), т. пл. $189-191^{\circ}\text{C}$, R_f 0,64 (Б), 0,35 (В), E_{HIS} 0,65. Найдено, %: С 45,04, Н 6,69, N 19,93. $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_7 \cdot \text{HCl} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 45,25, Н 6,86, N 20,08. k' 1,24 (рис. 4б).

Boc-Thr-Gln-Trp-Ala-Val-OH (XXIII). 0,9 г (1,7 ммоль) гидрохлорида (VIIIa) растворяли в 4 мл DMF, раствор охлаждали до 0°C и последовательно прибавляли 0,4 мл (3,4 ммоль) N-этилморфолина и 0,71 г (1,84 ммоль) *Boc-Thr-OPfp*. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 сут, затем упаривали, остаток обрабатывали эфиром, отфильтровывали, растворяли в воде, подкисляли 1,7 мл 1 н. HCl и экстрагировали (3×50 мл) *n*-бутанолом. Экстракт промывали водой, упаривали, остаток осаждали этилацетатом из метанола. Получали 0,87 г (74%) пентапептида (XXIII), т. пл. $155-162^{\circ}\text{C}$, R_f 0,82 (А). Найдено, %: С 54,86, Н 7,05, N 13,04. $\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{N}_7\text{O}_{10} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 54,91, Н 7,12, N 13,58.

Boc-Thr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2 (XXIV). 0,60 г (1,1 ммоль) дигидрохлорида тетрапептида (Va) растворяли в 3 мл DMF, охлаждали до -5°C и последовательно прибавляли 0,28 мл (2,2 ммоль) N-этилморфолина, 0,79 г (1,1 ммоль) пентапептида (XXIII), 0,14 г (1,2 ммоль) N-гидрокси-сукцинимид и охлажденный раствор 0,23 г (1,1 ммоль) DCC в 2 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при -5°C и 48 ч при комнатной температуре. Затем отфильтровывали N,N'-дициклогексилмочевину, фильтрат упаривали, остаток обрабатывали эфиром и растворяли в 15 мл воды. Вещество экстрагировали (3×40 мл) *n*-бутанолом, экстракт промывали водой, упаривали, остаток кристаллизовали из смеси метанола и этилацетата. Получали 0,61 г (47%) соединения (XXIV), R_f 0,88 (Н), 0,53 (В).

Thr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2 (XXIVa). 0,60 (0,5 ммоль) соединения (XXIV) деблокировали действием 2,2 мл (3,7 ммоль) 1,7 н. раствора хлористого водорода в ледяной уксусной кислоте в присутствии 0,1 мл 2-меркаптоэтанола и 0,1 мл диметилсульфида в течение 50 мин. Затем растворитель упаривали, остаток обрабатывали эфиром. 0,48 г (82%) деблокированного нонапептида (XXIVa) очищали методом ионообменной хроматографии на SP-сефадексе С-25 в пиридин-ацетатном буфере в интервале концентрации буфера 0,05-1,0 М. Получали 0,26 г (55%) соединения (XXIVa), R_f 0,58 (В), 0,53 (Ж), E_{HIS} 0,78, $[\alpha]_D^{22}$ $-48,6^{\circ}$ (c 1; 1% CH_3COOH), k' 3,12 (см. условия аналитической ВЭЖХ на рис. 1б). Аминокислотный анализ: Thr 0,93 (1), Glu 1,00 (1), Gly 0,92

(1), Ala 1,16 (1), Val 0,97 (1), Met 1,09 (1), Leu 0,97 (1), His 0,94 (1). *Glp-Gly-Arg-Leu-Gly-Thr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂* (алитезин) (XXV). 0,092 г (0,18 ммоль) соединения (XXII) суспендировали в 1 мл DMF, охлаждали до -15°C и при перемешивании прибавляли 0,02 мл (0,18 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 3 мин прибавляли охлажденный до -15°C раствор 0,20 г (0,18 ммоль) нонапептида (XXIVa) и 0,045 мл (0,36 ммоль) N-этилморфолина в 1 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 25 мин при -15°C и оставляли при комнатной температуре на 48 ч, после чего обрабатывали эфиром продукт реакции, осадок отфильтровывали и высушивали. 0,231 г сырого продукта очищали на колонке (1,3×23 см) с SP-сефадексом C-25 в стандартных условиях в интервале концентрации буфера 0,05–0,5 М. Получали 0,095 г (35%) алитезина (XXV), R_f 0,53 (B), 0,20 (M), 0,51 (Ж), 0,39 (И). E_{vis} 0,69. $[\alpha]_D^{22}$ $-46,5^{\circ}$ (c 1; 1% CH_3COOH), k' 4,59. Амминокислотный анализ: His 1,09 (1), Met 1,14 (1), Val 1,13 (1), Ala 1,21 (1), Gly 2,76 (3), Leu 2,00 (2), Arg 0,91 (1), Glu 2,22 (2), Thr 1,10 (1). Аналитическая ВЭЖХ алитезина (XXV) приведена на рис. 5б.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anastasi A., Erspamer V., Bucci M. // *Experientia*. 1971. V. 27. № 2. P. 166–167.
2. Anastasi A., Erspamer V., Bucci M. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1972. V. 148. P. 443–446.
3. Willareal J. A., Brown M. // *Life Sci.* 1978. V. 23. № 27–28. P. 2729–2733.
4. Walsh Y. H., Wong H. G., Dockray G. J. // *Federat. Proc.* 1979. V. 38. № 9. P. 2315–2319.
5. McDonald T. J., Jornvall H., Nilsson G., Vagne M., Bloom S. R., Mutt V. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1979. V. 90. № 1. P. 227–233.
6. Cutes E., Chan W., Track N. S // *Experientia*. 1981. V. 37. № 4. P. 765–767.
7. Nemeroff G. B., Luttlinger D., Prange A. J. // *Neuropeptides. Handbook of psychopharmacol.* V. 16. New York – London: Plenum Press, 1983. P. 363–366.
8. Bernardi R., Castiglione R., Goffredo O., Angelucci F. // *Experientia*. 1971. V. 27. № 8. P. 873–874.
9. Rivier J. E., Brown M. R. // *Biochemistry*. 1978. V. 17. № 9. P. 1771–1776.
10. Di Bello G., Lucchiarri A., Buso O. // *Gazz. chim. ital.* 1986. V. 116. № 5. P. 221–228.
11. Castiglione R., Angelucci F., Erspamer V., Erspamer G. F., Negri L. // *Peptides* 1972/Eds Hanson H., Jacubke H. D. Amsterdam: North-Holl., 1973. P. 463–466.
12. Kitagawa K., Ujita K., Kiso Y., Akita T., Nakata Y., Nakamoto N., Segawa T., Yajima H. // *Chem. Pharm. Bull.* 1979. V. 27. № 1. P. 48–57.
13. Akaji K., Fujii N., Yajima H., Moriga M., Aono M., Tagaki A. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1981. V. 18. № 2. P. 180–194.
14. Akaji K., Fujii N., Yajima H., Moriga M., Tagaki A., Mizuta K., Noguchi M., McDonald T. J. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1982. V. 20. № 3. P. 276–288.
15. Takuda T., Wakimasu M., Kobayashi S., Fujino M. // *Chem. Pharm. Bull.* 1982. V. 30. № 8. P. 2825–2835.
16. Беспалова Ж. Д. // Тез. докл. VI Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов. Рига: Зинатне, 1983. С. 348.
17. Куранова И. Л., Чуркина С. И., Ковалева Н. Г., Любмирова В. Л., Филонова Е. Б., Марьянович А. Т., Маргшинов В. Ф. // Тез. докл. VI Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов. Рига: Зинатне, 1983. С. 347.
18. Rao S. R., Bhatnagar R. S., Nitecki D. E. // *Biopolymer*. 1976. V. 15. P. 317–324.
19. Секацис И. П., Лиепиньш Э. Э., Анцанс Ю. Е., Берга Д. А., Чипенс Г. И. // *Био-орган. химия*. 1980. Т. 6. № 10. С. 1466–1475.
20. Wider G., Lee K. H., Wutrich K. // *J. Mol. Biol.* 1982. V. 155. № 3. P. 367–388.
21. Марьянович А. Т., Базарев В. Д., Куранова И. Л., Чуркина С. И. // *Физиол. журн. СССР*. 1984. Т. 70. № 4. С. 478–482.
22. Фокина А. А., Климов П. К., Куранова И. Л., Чуркина С. И. // *Физиол. журн. СССР*. 1984. Т. 70. № 6. С. 838–841.
23. Fletcher G. A., Jones J. H. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1972. V. 4. № 3. P. 347–371.
24. Fletcher G. A., Jones J. H. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1975. V. 7. № 2. P. 91–102.
25. Nagayama K., Kumar A., Wutrich K., Ernst R. R. // *J. Magn. Resonance*. 1980. V. 40. № 2. P. 321–334.
26. Bernardi R., Bosisio G., Castiglione R., Goffredo O., Chillemi F. // *Gazz. chim. ital.* 1964. V. 94. P. 853–865.
27. Kovacs J., Kisfaludi L., Ceprina M. A. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1967. V. 89. № 1. P. 183–184.

Поступила в редакцию
16.II.1988
После доработки
21.XII.1988

AMPHIBIAN BOMBESIN AND ITS ANALOGUE, ALYTESIN

KURANOVA I. L., CHURKINA S. I., LYUDMIROVA V. L., FILONOVA E. B.,
MUTULIS F. K.*, LIEPINSII E. E.*, SECACIS I. P.*, SAULITIS Yu. B.?,
GRIGORJEVA V. D.*

Leningrad State University;

**Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian
SSR, Riga*

A convenient route of synthesis of amphibian bombesin and bombesin-like peptide alytesin was found. These tetradecapeptides were obtained by assembling the 1-5 and 6-14 fragments by means of DCC-HONB or mixed anhydrides methods. Structure of the tetradecapeptides was confirmed by high resolution NMR spectroscopy data. The bombesin and alytesin synthesized potently decrease body temperature and stimulate pancreatic juice secretion.