



УДК 577.112.6

© 1990 г.

*Ш. Х. Халиков, М. И. Исмоилов, А. П. Шахматов***СИНТЕЗ 17-ЧЛЕННОГО ПЕПТИДА (143—159) — ФРАГМЕНТА
БЕЛКА VP₁ ВИРУСА ЯЩУРА A₁₂****I. СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ (143—145), (146—148), (149—152),
(153—155) И (156—159)***Таджикский государственный университет им. В. И. Ленина,
Душанбе*

Классическими методами пептидной химии синтезированы фрагменты (143—145), (146—148), (149—152), (153—155) и (156—159) 17-членного пептида белка VP₁ вируса ящура A₁₂. Конденсацию аминокислот осуществляли методами смешанных ангидридов, активированных эфиров и карбодимидным.

Борьба с ящуром, основным заболеванием домашних животных, имеет первостепенное значение. С ящуром борются посредством убоя заболевшего скота, санитарной изоляцией стад. Предупреждение заболевания ведется путем вакцинации. В настоящее время противоящурные вакцины готовятся из инактивированного вируса. Однако широкая практика производства и использования показала определенные недостатки таких вакцин. В частности, не исключается риск неполной инактивации вируса, в результате чего могут возникнуть очаги вспышек ящура при вакцинации животных. Кроме того, натуральные вакцины в большинстве случаев являются смесью различных веществ с огромным количеством балластных и высокотоксичных примесей из микробных клеток, питательной среды, из клеток, на которых выращиваются вирусы. Поэтому после прививки натуральными вакцинами могут возникнуть тяжелые побочные реакции.

Как известно, у вируса ящура имеется 7 типов и более 65 подтипов. Иммунизация вакцинами, приготовленными против одного типа или подтипа вируса, не гарантирует полную защиту от заражения вирусами других типов.

В связи с вышеизложенным в последние годы большое внимание привлекают идеи создания искусственных вакцин, когда в качестве антигенного материала используют синтетические пептиды, имитирующие антигенные детерминанты нативного белка и моделирующие каким-либо образом их пространственную структуру [1]. Вирус ящура — очень удобная модель для разработки таких вакцин.

После установления ключевой роли в антигенной и иммунологической активности вирусной частицы белка VP₁ [2], определения его первичной структуры [3] были сделаны попытки получить синтетические вакцины на основе этого белка. В настоящее время исследованы иммунологические свойства ряда синтетических пептидов, имитирующих антиген-детерминантный участок белка VP₁ вируса ящура типов O₁K [4, 5] и A₂₂ [6]. Было показано, что пептиды, имитирующие участки 140—160 и 200—213, обладают ярко выраженными антигенными и иммуногенными свойствами. Кроме того, было показано, что синтетический пептид, включающий последовательность двух различных областей (141—158 и 200—213), вызывал

Сокращения: THF — тетрагидрофуран, Tos-OH — *n*-толуолсульфокислота, DCHA — дидициклогексилламин, ONp — *n*-нитрофениловый эфир, ONSu — *N*-оксисукцинимидный эфир, Nps — *o*-нитрофенилсульфенил.

образование нейтрализующих антител с высоким уровнем и защищал крупный рогатый скот от заражения инфекционным вирусом [7].

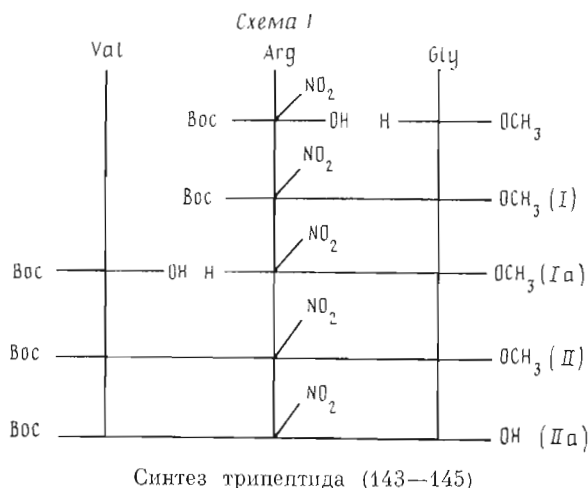
Цель настоящей работы — синтез 17-членного пептида из антиген-детерминантного участка (143—159) белка VP₁ вируса ящура A₁₂ с последовательностью

143

159

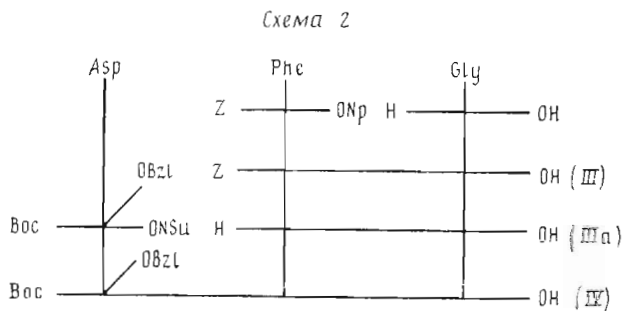
Val-Arg-Gly-Asp-Phe-Gly-Ser-Leu-Ala-Pro-Arg-Val-Ala-Arg-Gln-Leu-Pro

и дальнейшее изучение его антигенных и иммуногенных свойств. Настоящее сообщение посвящено синтезу исходных фрагментов (143—145), (146—148), (149—152), (153—155) и (156—159) (схемы 1—6). Разбивка целевой 17-членной последовательности на указанные фрагменты была осуществлена в основном с целью уменьшения рацемизации на стадии последующей конденсации, а также продиктована требованием достаточной растворимости синтезируемых пептидных блоков.



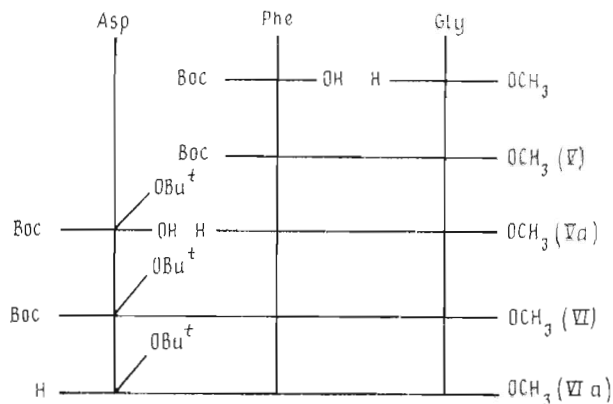
Для блокирования боковых функциональных групп в качестве постоянной защиты были использованы группы бензильного типа для пептидов последовательностей (146—148) (вариант 1) и (149—152) (соответственно схема 2, 4) и *tert*-бутильного — для трипептида (146—148) (вариант 2, схема 3), причем гуанидиновые группы остатков аргинина были защищены нитрогруппой, устойчивой в кислых условиях при снятии временных защитных групп. В зависимости от свойств получаемых пептидов и тактики их синтеза в качестве временных N^α-защитных групп использовались Boc-, Z-, Nps-группы.

Все перечисленные пептиды получали ступенчатым наращиванием пептидной цепи с C-конца. Выбор двух вариантов синтеза трипептида (146—148) (в схемах 2 и 3) был связан, во-первых, с необходимостью получения на основе фрагментов его последовательности различных



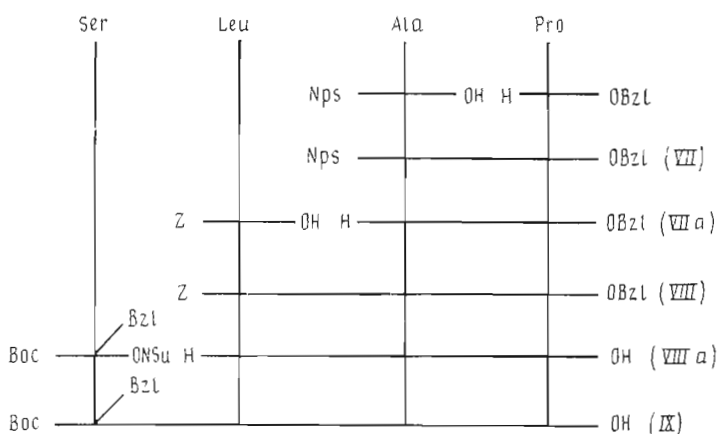
Первый вариант синтеза трипептида (146—148)

Схема 3



Второй вариант синтеза трипептида (146—148)

Схема 4



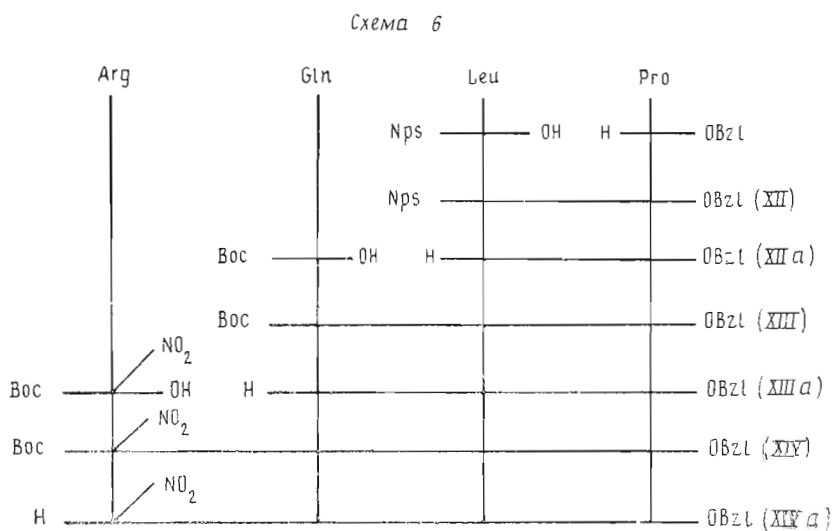
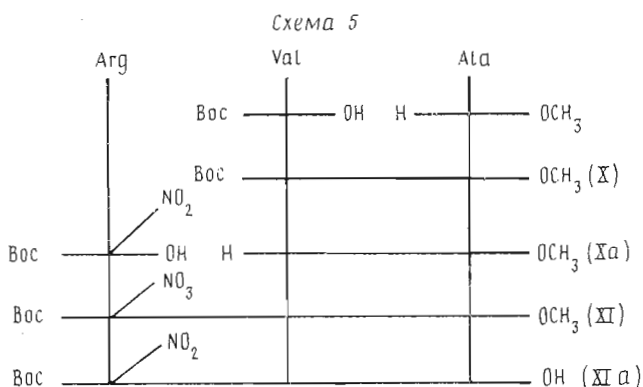
Синтез тетрапептида (149—152)

перекрывающихся пептидов, а во-вторых, с поиском оптимальной схемы синтеза 17-членного пептида. Поскольку для конденсации блоков необходимо наличие свободной α -карбоксовой группы С-концевой аминокислоты, возникла необходимость подбирать подходящую защиту для α -карбоксовой группы или оставлять ее свободной. При получении блоков мы использовали оба варианта.

α -СООН-группы превращали в метиловые (схемы 1, 3, 5) или бензильные (схемы 2, 4, 6) эфиры. В случае получения фрагментов (146—148) (вариант 1) и (149—152) (на последней стадии) α -карбоксовую группу оставляли свободной. Тактика защиты диктовалась природой концевой аминокислоты, свойствами используемых N-защитных групп, а также требованием уменьшения степени рацемизации при снятии α -карбоксовых защитных групп.

При получении блоков конденсацию осуществляли в основном методом смешанных ангидридов. В ряде случаев применяли метод активированных эфиров и карбодиимидный. Выбор метода смешанных ангидридов как основного был обусловлен доступностью реагентов и простотой постановки эксперимента. Этот метод позволял получать пептиды с достаточно хорошими выходами без применения трудоемких способов очистки. Имеющаяся опасность рацемизации по возможности сводилась к минимуму соблюдением условий Андерсона [8]. Как правило, все пептиды, синтезированные этим методом, после обычной обработки реакционной смеси и перекристаллизации или пересадки получались достаточно чистыми. Некоторые пептиды, полученные методом активированных эфи-

ров (соединение (IV)) и карбодимидными (соединения (IX) и (XII)), очищались хроматографически на колонке с силикагелем.



Временные N^{α} -Z- и Bzl-защитные группы с пептидов удаляли каталитическим гидрированием над Pd/C в метанольном растворе в присутствии уксусной кислоты. Вос-защитные группы снимали действием раствора HCl в уксусной кислоте или этилацетате.

Для отщепления Вос-защиты в присутствии сложноэфирной Bu' -группы предложено использовать кислоты средней силы: муравьиную [9] и *o*-толуолсульфокислоту [10]. Применение нами 98% муравьиной кислоты для снятия Вос-группы с соединения (VI) в течение 2,5—3,5 ч привело к заметному отщеплению OBu' -группы. Для подавления этого процесса реакцию проводили в смеси *tert*-бутанол—муравьиная кислота (8 : 2), однако и в этом случае наблюдалось частичное отщепление сложноэфирной Bu' -группы.

Очистка фрагмента — трипептида (соединение (VIa)) от исходных и побочных продуктов со свободной группой β -COOH аспарагиновой кислоты путем переосаждения и кристаллизации приводила к увеличению количества последних продуктов. Поэтому соединение (VIa) для дальнейшей реакции конденсации использовали сразу после удаления растворителя и сушки. Омыление метилового эфира трипептида (II) осуществляли действием щелочи на его метанольный раствор. В случае метилового эфира (XI) омыление проводили действием раствора K_2CO_3 на раствор пептида в смеси хлороформ — метанол (4 : 1) в течение 3—4 ч. Следует

отметить, что после осуществления гидролиза метиловых эфиров аргининсодержащих пептидов трудно было выделить продукты реакции экстракцией из подкисленной реакционной смеси. Это было связано с тем, что N-ацилпептиды, содержащие остаток аргинина, со свободной α -COOH-группой оказались хорошо растворимыми в таких растворителях, как ацетон, метанол, этанол, в их смеси с водой, но нерастворимы в таких не смешивающихся с водой растворителях, как эфир, этилацетат, хлороформ, бутанол. Поэтому продукты реакции после омыления были выделены путем удаления катионов натрия и калия действием катионита — дауэкс 50W \times 8 (H^+ -форма). В свою очередь очистка омыленных пептидов осуществлялась путем осаждения их натриевых и калиевых солей из метанола ацетоном, а также кристаллизацией.

Однако аргининсодержащие пептиды с защищенной C-концевой α -COOH-группой и соединение (IX) растворялись только в DMF, смеси хлороформ — метанол (4 : 1), а некоторые пептиды (II, IIa, IV, VI, XI) — еще в ацетоне и метаноле.

Поскольку при кислотном гидролизе N-защищенных пептидов, содержащих остатки нитроаргинина, наблюдается неполное отщепление NO_2 -группы [11] и, как следствие этого, при аминокислотном анализе сильно занижается содержание аргинина, аминокислотный анализ пептидов (IIa), (XIa) и (XIVa) осуществляли после удаления NO_2 , а также Bzl-групп путем каталитического гидрирования.

Экспериментальная часть

В работе использовали производные аминокислот фирмы Reanal (Венгрия). ТСХ проводили на хроматографических пластинках Silufol (ЧСФР) и Kieselgel-60 на стеклянной подложке № 5724 (Merck, ФРГ) в следующих системах растворителей: толуол — диоксан — циклогексан — этанол, 10 : 6 : 3 : 1 (А); толуол — диоксан — циклогексан — уксусная кислота, 10 : 6 : 3 : 1 (Б); хлороформ — метанол — циклогексан, 70 : 15 : 15 (В); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 18 : 2 : 1 (Г); *втор*-бутанол — пиридин — вода, 100 : 45 : 5 (Д); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Е); пиридин — уксусная кислота — вода — этилацетат, 20 : 6 : 11 : 90 (Ж); *n*-бутанол — вода — пиридин — уксусная кислота, 30 : 24 : 20 : 6 (З); хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 100 : 20 : 10 : 2 (И). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью пингидрина и реагента Cl_2 -бензилидин-К1. Гидрирование пептидов проводили в присутствии Pd/C фирмы Merck (5 и 10% по весу).

Для колоночной хроматографии использовали силикагель марки L 100/160 (Chemapol, ЧСФР). Удельное оптическое вращение определяли на поляриметре Polamat (ГДР). Температуры плавления определяли на приборе Voetius (ГДР). Гидролиз защищенных пептидов (пептиды, содержащие остатки аргинина, предварительно гидрировали) осуществляли в 6 н. HCl с 2% фенола при 105—110° С в течение 24 ч. Гидролизаты анализировали на приборе Hitachi-635 (Япония). Растворы упаривали в вакууме при 40—50° С (ссылки не указаны температуры).

Boc-Arg(NO₂)-Gly-OCH₃ (I). К охлажденному до —25° С раствору 4,8 г (15 ммоль) *Boc-Arg(NO₂)-OH* и 1,67 мл (15 ммоль) N-метилморфолина в 35 мл THF при перемешивании прибавляли 1,97 мл (15 ммоль) изобутилхлорформиата. Смесь перемешивали 2,5 мин при —25° С и прибавляли к ней охлажденный раствор 1,88 (15 ммоль) хлоргидрата метилового эфира глицина в 35 мл DMF, содержащий 1,67 мл (15 ммоль) N-метилморфолина. Перемешивание продолжали 3 ч при —25° — —10° С. Затем температуру повышали до 20° С и оставляли на 16 ч. Добавляли 2 мл 50% CH_3COOH , растворитель упаривали, остаток обрабатывали 250 мл этилацетата в присутствии 20 мл насыщенного раствора Na_2SO_4 . Органический слой последовательно промывали 2 М K_2CO_3 и насыщенным раствором Na_2SO_4 до нейтральной реакции промывных вод. После сушки над Na_2SO_4 и удаления растворителя остаток дважды кристаллизовали из смеси хлороформ — этилацетат (1 : 2), получали 3,88 (65,3%) продук-

та (I). Т. пл. 141—142° С, R_f 0,59 (В), 0,49 (Г), 0,84 (И); $[\alpha]_D^{20}$ —6,88° (c 1, CH_3OH).

HCl·H-Arg(NO₂)-Gly-OCH₃ (Ia). К раствору 4 г (10,25 ммоль) соединения (I) в 10 мл уксусной кислоты прибавляли 20 мл 3 н. HCl в уксусной кислоте. Выдерживали 30 мин при 20° С, удаляли растворитель при 20° С. Остаток растворяли в метаноле, метанол удаляли и остаток сушили в вакууме. Полученный пенообразный остаток соединения (Ia) растворяли в 30 мл DMF, добавляли 1,15 мл (10,25 ммоль) N-метилморфолина и охлаждали до —25° С.

Boc-Val-Arg(NO₂)-Gly-OCH₃ (II). 4,5 г (11,29 ммоль) Boc-Val·DCHA освобождали от DCHA действием 18 г дауэкса 50W × 8 (H⁺-форма) в 50 мл метанола [12]. После удаления катионита и растворителя остаток растворяли в 50 мл THF. К полученному раствору добавляли 1,26 мл (11,25 ммоль) N-метилморфолина, охлаждали до —25° С и при перемешивании прибавляли 1,47 мл (11,22 ммоль) изобутилхлорформата. Через 2 мин к нему прибавляли раствор соединения (Ia). Продолжали перемешивать 2 ч при —25 ÷ —10° С, 2 ч при 20° С и оставляли на 16 ч. Растворитель удаляли, остаток растворяли в 200 мл этилацетата в присутствии 20 мл насыщенного раствора Na₂SO₄. Органический слой последовательно промывали насыщенным раствором Na₂SO₄, 2 М K₂CO₃ и снова насыщенным раствором Na₂SO₄ до нейтральной реакции промывных вод. Раствор сушили над Na₂SO₄. После удаления осушителя раствор упаривали и полученный остаток растворяли в 100 мл метанола. К раствору добавляли 5 г дауэкса 50 W × 8 (H⁺-форма), перемешивали 45 мин. Катионит отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток переосаждали из ацетона эфиром при охлаждении. Осадок отфильтровывали, растворяли в хлороформе, осаждали этилацетатом и промывали этилацетатом, гексаном. Выход продукта (II) 2,38 г (47,3%). Т. пл. 83—88° С. R_f 0,58 (В), 0,50 (Г), 0,85 (И), $[\alpha]_D^{20}$ —30,88° (c 1, CH_3OH).

Boc-Val-Arg(NO₂)-Gly-OH (IIa). 1 г (2,04 ммоль) соединения (II) в 15 мл метанола гидролизovali действием 1 н. NaOH в течение 4 ч при 20° С (2,5 мл (2,5 ммоль) 1 н. NaOH прибавляли порциями по 0,5 мл через 30 мин). После завершения реакции раствор насыщали углекислым газом и удаляли растворитель при 25—30° С. Остаток растворяли в 10 мл метанола, разбавляли ацетоном и охлаждали. Выделившийся гелеобразный осадок отфильтровывали и промывали ацетоном. Осадок растворяли в 20 мл смеси вода — метанол (1 : 1), прибавляли 3 г дауэкса 50W × 8 (H⁺-форма) и перемешивали 30 мин. Катионит отфильтровывали и промывали метанолом. Фильтрат упаривали и остаток дважды переосаждали из ацетона эфиром. Выход соединения (IIa) 0,73 г (75,2%). Т. пл. 100—107° С, R_f 0,30 (В), 0,24 (Г), 0,66 (И). $[\alpha]_D^{20}$ —32,74° (c 1, CH_3OH). Аминокислотный анализ: Val 0,95 (1), Arg 0,91 (1), Gly 1,00 (1).

Z-Phe-Gly-OH (III). 1,5 г (20 ммоль) глицина растворяли в 20 мл (18,4 ммоль) 0,92 н. NaOH. Воду удаляли при пониженном давлении, к остатку добавляли 30 мл DMF и охлаждали до 5° С. Добавляли 6,3 г (15 ммоль) Z-Phe-ONp в 30 мл DMF. Смесь перемешивали 24 ч при 20° С, растворитель упаривали, остаток растворяли в воде и экстрагировали эфиром. Водный слой подкисляли 1 н. HCl и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный раствор промывали водой, сушили и упаривали. После кристаллизации из эфира получили 4,3 г (80,5%) продукта (III). Т. пл. 146—147° С, R_f 0,37 (В), 0,43 (Г), $[\alpha]_D^{20}$ —12,02° (c 2, CH_3OH).

Boc-Asp(OBzl)-Phe-Gly-OH (IV). К смеси 15 мл метанола и 1 мл уксусной кислоты добавляли 100 мг Pd/C, при перемешивании насыщали водородом в течение 30 мин. Прибавляли раствор 2 г (5,61 ммоль) пептида (III) в 15 мл метанола и продолжали гидрирование в течение 3 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток переосаждали из метанола эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали, сушили в вакуумном эксикаторе над KOH и P₂O₅. Полученный продукт (IIIa) растворяли в 10 мл DMF, добавляли 0,61 мл (5,5 ммоль) N-метилморфолина и охлаждали до —25° С.

К полученному раствору пептида (IIIa) прибавляли охлажденный раствор 2,31 г (5,5 ммоль) $\text{Woc-Asp(OBzl)-ONSu}$ в 25 мл DMF. Смесь перемешивали 48 ч при 20° С. Растворитель упаривали, остаток обрабатывали эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, осадок растворяли в 15 мл хлороформа и наносили на колонку (3 × 7,5 см) с силикагелем, уравновешенным хлороформом. Колонку элюировали последовательно хлороформом, смесью хлороформ — метанол (100 : 5), хлороформ — метанол (10 : 1) и ацетоном. Основное вещество элюировалось со смесью хлороформ — метанол (10 : 1) (контроль ТСХ). Собирали фракция, содержащие основное вещество. После удаления растворителя остаток переосаждали из ацетона этилацетатом. Выход продукта (IV) 1,75 г (60,3%). Т. пл. 121—124° С. R_f 0,61 (A), 0,15 (B), 0,57 (B), 0,58 (D), $[\alpha]_D^{20} = -31,64^\circ$ (*c* 1, CH_3OH). Аминокислотный анализ: Asp 0,98 (1), Phe 0,96 (1), Gly 1 (1).

Woc-Phe-Gly-OCH_3 (V). К раствору 3,13 г (7 ммоль) $\text{Woc-Phe-OH} \cdot \text{DCHA}$ в 150 мл эфира добавляли 30 мл 0,4 М раствора лимонной кислоты. После сушки и удаления растворителя маслообразный остаток Woc-Phe-OH растворяли в 20 мл DMF, прибавляли 0,78 мл (7 ммоль) *N*-метилморфолина. Полученный раствор охлаждали до -25° С и при сильном перемешивании прибавляли 0,91 мл (6,95 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 3 мин прибавляли к нему охлажденный раствор 1,1 г (8,71 ммоль) хлоргидрата метилового эфира глицина в 20 мл DMF, содержащего 0,98 мл (8,75 ммоль) *N*-метилморфолина. Продолжали перемешивание 3 ч при -25 ÷ -10° С, 1 ч при -10 ÷ 20° С и оставляли на ночь. После удаления растворителя остаток растворяли в эфире, последовательно промывали 0,4 М лимонной кислотой, водой, 0,5 н. NaHCO_3 и снова водой. Раствор сушили, упаривали и остаток кристаллизовали из ацетона — гексана (при охлаждении до -10° С). Выход продукта (V) 1,95 г (83%). Т. пл. 92—93° С. R_f 0,70 (A), 0,63 (B), 0,86 (D), R_f 0,92 (Ж), $[\alpha]_D^{20} = -6,29^\circ$ (*c* 1, CH_3OH).

$\text{Woc-Asp(OBu}^t\text{)-Phe-Gly-OCH}_3$ (VI). Исходя из 3,03 г (9 ммоль) соединения (V) в 10 мл уксусной кислоты действием 20 мл 3 н. раствора HCl в уксусной кислоте аналогично соединению (Ia) получали пептид HCl·II-Phe-Gly-OCH₃ (Va). R_f 0,36 (E), 0,84 (З). Полученное пенообразное, гигроскопичное вещество растворяли 30 мл DMF, добавляли 1 мл (9 ммоль) *N*-метилморфолина и охлаждали до -25° С.

К раствору 4,75 г (10,1 ммоль) $\text{Woc-Asp(OBu}^t\text{)-OH} \cdot \text{DCHA}$ в 150 мл этилацетата добавляли 0,4 М раствор лимонной кислоты. Полученный $\text{Woc-Asp(OBu}^t\text{)-OH}$ растворяли в 30 мл THF, добавляли 1,12 мл (10 ммоль) *N*-метилморфолина и охлаждали до -25° С. При перемешивании прибавляли 1,31 мл (10 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 3 мин к нему добавляли раствор соединения (Va). Далее реакцию проводили по обычной методике. Продукт кристаллизовали из эфира. Общий выход продукта (VI) 3,2 г (70%). Т. пл. 126—128° С, R_f 0,72 (A), 0,61 (B), 0,80 (B) 0,93 (D), $[\alpha]_D^{21} = -33,57^\circ$ (*c* 1, CH_3OH). Аминокислотный анализ: Asp 1,03 (1), Phe 0,95 (1), Gly 1,0 (1).

$\text{HCOOH} \cdot \text{H-Asp(OBu}^t\text{)-Phe-Gly-OCH}_3$ (VIa). Раствор 0,21 г (0,24 ммоль) соединения (VI) в смеси 8 мл *трет*-бутанола и 13 мл муравьиной кислоты, содержащей 2 мл анизол, выдерживали 2,5 ч при 20° С. Растворители удаляли в вакууме при 20° С. Остаток переосаждали из раствора *трет*-бутанол — муравьиная кислота (8 : 2) в эфир и гексан. Выпавший гелеобразный осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили под вакуумом. Выход смеси продуктов (VIa) 0,19 г (93,4%), твердый гель. R_f 0,45; 0,32* (D), 0,33; 0,10* (E), 0,86; 0,74* (З).

Nps-Ala-Pro-OBzl (VII). К раствору 12,68 г (29,98 ммоль) $\text{Nps-Ala-OH} \cdot \text{DCHA}$ в 200 мл этилацетата добавляли 40 мл 1 н. H_2SO_4 для освобождения от DCHA [13]. После сушки и удаления растворителя полученный Nps-Ala-OH (7,25 г, 29,26 ммоль) растворяли в 80 мл этилацетата, добавляли 6,58 г (27,22 ммоль) хлоргидрата бензилового эфира пролина и

* R_f для побочного продукта (HCOOH·II-Asp-Phe-Gly-OCH₃).

3,05 мл (27,23 ммоль) N-метилморфолина. Смесь охлаждали до -25°C и при перемешивании добавляли 6,1 г (29,61 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимид. Продолжали перемешивать 1 ч при $-20 \div -5^{\circ}\text{C}$, 3 ч при 20°C и оставляли на 16 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом, прибавляли 3 мл 50% CH_3COOH и через 30 мин отфильтровывали выпавшую N,N'-дициклогексилмочевину. Фильтрат последовательно промывали 1 н. H_2SO_4 , водой, 0,5 н. NaHCO_3 и снова водой. Раствор сушили, упаривали, остаток кристаллизовали из холодного эфирного раствора (48 ч при -10°C). Общий выход продукта (VII) 9,59 г (80,3%), R_f 0,70 (A), 0,79 (B), 0,74 (Г), 0,91 (Д), $[\alpha]_D^{20} -135,34^{\circ}$ (с 1, CHCl_3).

HCl·H-Ala-Pro-OBzl (VIIa). К раствору 3,83 г соединения (VII) в 70 мл этилацетата, содержащего 4 мл анизола, прибавляли 12 мл 4 н. раствора HCl в этилацетате. Полученный раствор с гелеобразным осадком выдерживали 30 мин при -10°C . Выпавший осадок отфильтровывали и промывали эфиром. Дважды переосаждали из хлороформа эфиром. Выход продукта (VIIa) 2,33 г (85,3%). Т. пл. $177-179^{\circ}\text{C}$, R_f 0,48 (Д), 0,22 (E), 0,70 (Ж), 0,74 (З), $[\alpha]_D^{24} -94,58^{\circ}$ (с 1, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 4 : 1).

Z-Leu-Ala-Pro-OBzl (VIII). К охлажденному до -15°C раствору 3,31 г (12,5 ммоль) Z-Leu-OH, 1,4 мл (12,5 ммоль) N-метилморфолина в 20 мл THF при перемешивании прибавляли 1,63 мл (12,44 ммоль) изобутилхлорформата. Через 3 мин добавляли охлажденный раствор 3,26 г (10,42 ммоль) соединения (VIIa) в смеси THF — DMF (10—25 мл), содержащий 1,17 мл (10,44 ммоль) N-метилморфолина. Далее реакцию проводили по обычной методике. После удаления растворителя остаток растворяли в эфире, охлаждали, продукт осаждали холодным гексаном. Холодный верхний растворитель декантировали, остаток сушили в вакууме. Выход аморфного продукта (VIII) 5,08 г (93,1%), R_f 0,56 (A), 0,64 (B), 0,66 (B), 0,71 (Г), 0,91 (Д), $[\alpha]_D^{20} -93,25^{\circ}$ (с 1, CH_3OH).

Woc-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-OH·DCNA (IX). 3,67 г (7 ммоль) соединения (VII) гидрировали в 30 мл металона в присутствии 5 мл уксусной кислоты. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток соединения (VIIa) сушили в вакуумном эксикаторе над KOH и переосаждали из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) эфиром. Растворитель декантировали, осадок сушили в вакууме. Т. пл. $139-141^{\circ}\text{C}$, R_f 0,34 (З).

Продукт (VIIa) суспендировали в смеси 10 мл THF и 20 мл CH_2Cl_2 . При перемешивании прибавляли 2,86 г (7,27 ммоль) Woc-Ser(Bzl)-ONSu и 0,89 мл (7,0 ммоль) N-метилморфолина. Перемешивали 2 ч, растворитель упаривали, остаток растворяли в 25 мл хлороформа и наносили на колонку (2,5 × 27 см) с силикагелем, уравновешенным хлороформом. Колонку элюировали вначале хлороформом до полного удаления непрореагировавшего эфира, затем смесью хлороформ — метанол — циклогексан 200 : 15 : 15 (30 мл), 150 : 15 : 15 (30 мл), 100 : 15 : 15 (30 мл) и 70 : 15 : 15 (100 мл). Собирали фракции элюатов, содержащие основное вещество (контроль ТСХ), упаривали, сушили под вакуумом. Остаток растворяли в 5 мл хлороформа и добавляли 1,4 мл (7,0 ммоль) DCNA. Продукт осаждали при охлаждении гексаном. Осадок кристаллизовали при охлаждении из ацетона (-10°C , 24 ч). Общий выход продукта (IX) 3,66 г (72%). Т. пл. $126-129^{\circ}\text{C}$, R_f 0,56 (A), 0,14 (B), 0,53 (Д), 0,60 (Ж), $[\alpha]_D^{20} -57,25^{\circ}$ (с 1, CH_3OH). Аминокислотный анализ: Ser 0,95 (1), Leu 1,03 (1), Ala 1 (1), Pro 0,97 (1).

Woc-Val-Ala-OCH₃ (X) получали аналогично соединению (V) из 15 г Woc-Val-OH·DCNA, 4,21 мл (37,6 ммоль) N-метилморфолина, 4,92 мл (37,56 ммоль) изобутилформиата в 100 мл THF и 5,76 г (41,26 ммоль) хлоргидрата метилового эфира аланина в 50 мл DMF, содержащего 4,62 мл (41,25 ммоль) N-метилморфолина. Продукт кристаллизовали при охлаждении из смеси этилацетат — пентан (1 : 5) (-10°C). Общий выход продукта (X) 8,48 г (74,5%). Т. пл. $140-141^{\circ}\text{C}$, R_f 0,69 (A), 0,63 (B), 0,63 (B), 0,74 (Г), 0,87 (Д), $[\alpha]_D^{20} -33,67^{\circ}$ (с 1, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 4 : 1).

Woc-Arg(NO₂)-Val-Ala-OCH₃ (XI). Исходя из 3,03 г (10 ммоль) соединения (X) и 12 мл 3 н. раствора HCl в этилацетате аналогично соединению

(Ia) получали $\text{HCl} \cdot \text{H-Val-Gly-OCH}_3$ (Xa), R_f 0,39 (Д), 0,20 (Е), 0,18 (Ж), 0,66 (З). Гигроскопичный продукт (Xa) растворяли в 35 мл ТНФ, добавляли 1,12 мл (10 ммоль) *N*-метилморфолина и охлаждали до -25°C .

3,52 г (11,03 ммоль) *Woc-Arg(NO}_2\text{)-OH}* растворяли в горячем ТНФ в присутствии 1,23 мл (11 ммоль) *N*-метилморфолина. Раствор охлаждали до -25°C , при перемешивании прибавляли 1,44 мл (11,0 ммоль) изобутилхлорформиата и через 3 мин раствор пептида (Xa). Реакционную смесь продолжали перемешивать 2 ч при $-25 \div -10^\circ \text{C}$, 2 ч при 20°C . Растворитель упаривали, остаток растворяли в этилацетате в присутствии воды. Органический слой промывали последовательно 0,4 М лимонной кислотой, водой, 0,5 н. NaHCO_3 и снова водой. Растворитель упаривали, остаток сушили в вакууме при 50°C . Осадок дважды кристаллизовали из горячего этилацетата путем охлаждения и разбавления эфиром. Общий выход продукта (XI) 3,8 г (75,5%). Т. пл. $182-183,5^\circ \text{C}$. R_f 0,32 (Б), 0,40 (В), 0,24 (Г), 0,85 (Д), $[\alpha]_D^{20} -37,47^\circ$ (c 1, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 4 : 1).

Woc-Arg(NO}_2\text{)-Val-Ala-OH (XIa) получали аналогично соединению (IIa) из 1,11 г (2,2 ммоль) соединения (XI) в 25 мл метанола действием $4 \times 1,5$ мл (6,0 мл, 3 ммоль) 0,5 М K_2CO_3 , а также 5 г дауэкса 50W \times 8 (H^+ -форма). Продолжительность реакции 4 ч. Продукт кристаллизовали из горячего ацетонного раствора этилацетатом путем охлаждения до -10°C . Выход продукта (XIa) 1,02 г (94,8%). Т. пл. $106-109^\circ \text{C}$. R_f 0,33 (В), 0,17 (Г), 0,50 (Д), $[\alpha]_D^{23} -18,12^\circ$ (c 1, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 4 : 1). Аминокислотный анализ: Arg 0,96 (1), Val 1,05 (1), Ala 1 (1).

Nps-Leu-Pro-OBzl (XII). К раствору 15,92 г (34,2 ммоль) *Nps-Leu-OH} \cdot \text{DCNA} в 200 мл эфира добавляли 40 мл 1 н. H_2SO_4 [13]. После сушки и удаления растворителя получали 9,9 г *Nps-Leu-OH}*.*

К раствору 15,06 г (40 ммоль) *Tos-OH} \cdot \text{Pro-OBzl} в 50 мл воды прибавляли 5 г NaHCO_3 и Na_2SO_4 до насыщения. Свободный *H-Pro-OBzl}* экстрагировали хлороформом до его исчезновения в водном растворе (контроль ТСХ). Хлороформную вытяжку сушили безводным MgSO_4 , фильтровали. Фильтрат добавляли к *Nps-Leu-OH}*, упаривали и сушили в вакууме.*

Образовавшуюся смесь (17,4 г масла) растворяли в 50 мл CH_2Cl_2 , охлаждали до -15°C и при перемешивании прибавляли 8 г (38,83 ммоль) *N,N'*-дидиклогексилкарбодиимида. Продолжали перемешивать 1 ч при $-15 \div -5^\circ \text{C}$, 2 ч при 0°C , 1 ч при 20°C и оставляли на 16 ч. Прибавляли 5 мл 50% CH_3COOH , через 30 мин отфильтровали выпавшую *N,N'*-дидиклогексилмочевину. Фильтрат упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали последовательно 1 н. H_2SO_4 , водой, 0,5 н. NaHCO_3 и снова водой. Раствор сушили, упаривали, остаток растворяли в 20 мл CCl_4 и наносили на колонку (3×50 см) с силикагелем, уравновешенным CCl_4 . Колонку элюировали вначале CCl_4 , затем CHCl_3 . Собрали хлороформные фракции элюатов, содержащие основной продукт (контроль ТСХ), растворитель упаривали, сушили в вакууме при 50°C и получили 12,54 г (77,8%) густого маслообразного продукта (XII). R_f 0,81 (А), 0,83 (Б), 0,86 (В), $[\alpha]_D^{17} -125,89^\circ$ (c 1, CHCl_3).

Woc-Gln-Leu-Pro-OBzl (XIII). К охлажденному до 4°C раствору 5,53 г (11,73 ммоль) соединения (XII) в 40 мл эфира прибавляли 12 мл 3 н. HCl в этилацетате. Выдерживали 10 мин при 20°C , 20 мин при 4°C . Растворитель упаривали при 20°C . Остаток растворяли в эфире и охлаждали в течение 2 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром до обесцвечивания фильтрата. Осадок вначале переосаждали из хлороформного раствора эфиром, затем из хлороформа этилацетатом. Выход продукта $\text{HCl} \cdot \text{H-Leu-Pro-OBzl}$ (XIIIa) 3,19 г (9,0 ммоль) — 76,7%. Т. пл. $158-159^\circ \text{C}$. R_f 0,34 (В), 0,89 (Ж), $[\alpha]_D^{20,5} -68,54^\circ$ (c 1, CH_3OH).

Полученный продукт растворяли в 20 мл DMF, прибавляли 1 мл (9,0 ммоль) *N*-метилморфолина и охлаждали до -20°C .

К охлажденному до -20°C раствору 2,66 г (10,79 ммоль) *Woc-Gln-OH} в 15 мл DMF, 1,2 мл (10,71 ммоль) *N*-метилморфолина при перемешивании прибавляли 1,40 мл (10,69 ммоль) изобутилхлорформиата и через 2 мин раствор пептида (XIIIa). Продолжали перемешивать 2 ч при $-20 \div$*

÷ —5° С, 2 ч при 20° С и оставляли на 16 ч. Растворитель упаривали. Остаток растворяли в этилацетате в присутствии воды. Органический слой промывали последовательно 0,4 М лимонной кислотой, водой, 0,5 н. NaHCO₃ и снова водой. Раствор сушили, упаривали, остаток растворяли в эфире и осаждали гексаном при охлаждении. Органический слой декантировали и осадок сушили в вакууме. Выход продукта (XIII) 4,5 г (91,6%). R_f 0,42 (Б), 0,39 (В), 0,81 (Д), $[\alpha]_D^{20}$ —77,42° (с 1, CHCl₃).

Woc-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (XIV). К раствору 3,4 г (6,23 ммоль) соединения (XIII) в 5 мл эфира прибавляли 13 мл 3 н. раствора HCl в этилацетате. Выдерживали 40 мин при 20° С. Реакционную смесь разбавляли эфиром и декантировали. Маслообразный остаток сушили под вакуумом. Полученный порошкообразный продукт переосаждали из хлороформного раствора эфиром в присутствии гексана. Выход HCl·H-Gln-Leu-Pro-OBzl (XIIIa) 2,68 г (89%). Т. пл. 70—72° С. R_f 0,87 (З), $[\alpha]_D^{22}$ —72,33° (с 1, CHCl₃). Продукт (2 г, 4,14 ммоль) растворяли в 20 мл THF, прибавляли 0,464 мл (4,14 ммоль) N-метилморфолина и охлаждали до —20° С.

1,76 г (4,95 ммоль) *Woc-Arg(NO₂)-OH*· $\frac{1}{2}$ THF растворяли при нагревании в 20 мл THF в присутствии 0,515 мл (4,6 ммоль) N-метилморфолина. Раствор охлаждали до —20° С, при перемешивании прибавляли 0,6 мл (4,58 ммоль) изобутилхлорформата и через 3 мин раствор пептида (XIIIa). Продолжали перемешивать 1 ч при —20 ÷ —0° С, 1 ч при 20° С и оставляли на 16 ч. Образовавшуюся густую массу перемешивали 2 ч при 20° С, прибавляли 1 мл H₂O. Выделившийся осадок отфильтровывали, промывали водой и хлороформом.

Пептид (XIV) кристаллизовали из горячего этилацетата, затем из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) этилацетатом. Путем обычной методики обработки из маточников также был получен продукт (XIV). Общий выход пептида (XIV) 2,41 г (79%). R_f 0,20 (Б), 0,30 (В), 0,1 (Г), 0,79 (Д), $[\alpha]_D^{20}$ —48,44° (с 1, DMF).

HCl·H-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (XIVa). К раствору 1,72 г (2,3 ммоль) соединения (XIV) в 4 мл уксусной кислоты прибавляли 5 мл 4 н. HCl в уксусной кислоте. Смесь выдерживали 20 мин при 20° С. Растворитель удаляли при 20° С. Остаток дважды переосаждали из раствора в смеси хлороформ — метанол (4 : 1) эфиром. Выход продукта (XIVa) 1,54 г (97,9%). Т. пл. 139—140° С, R_f 0,41 (Е), 0,61 (Ж), 0,70 (З). $[\alpha]_D^{20}$ —51,28° (с 1, CHCl₃ — CH₃OH, 4 : 1). Аминокислотный анализ: Arg 0,94 (1), Glu 0,95 (1), Leu 1 (1), Pro 0,97 (1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петров П. В. // Природа. 1984. Т. 10. С. 3—12.
2. Laporte J., Grosclaude J., Wantyghen J., Bernard S., Rouze P. // C. r. Acad. sci. 1973. V. 276. № 25. P. 3399—3401.
3. Kurs C., Forss S., Kupper H., Strohmaier K., Schaller H. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 8. P. 1919—1931.
4. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. // Nature. 1982. V. 298. № 5869. P. 30—33.
5. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H. O., Schulz G. E., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869—874.
6. Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1132—1135.
7. Di Marchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., Mowat N. // Science. 1986. V. 232. № 4750. P. 639—641.
8. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1967. V. 89. № 19. P. 5012—5017.
9. Halpern B., Nitecki D. E. // Tetrahedron Lett. 1967. № 31. P. 3034—3033.
10. Goodacre J., Ponsford R. J., Stirling I. // Tetrahedron Lett. 1975. № 42. P. 3609—3612.
11. Кривцов В. Ф., Цитовская Г. А., Швачкин Ю. П. // Биохимия. 1970. Т. 35. Вып. 6. С. 1118—1122.
12. Коломейцева Л. А., Гирин С. К., Груздев В. С., Рябцев М. Н., Новоселов В. А.

- Бруценцев Н. А., Швакин Ю. П.* Способ получения N^ω-Вос-аминокислот: А. с. 332077 СССР // Б. И. 1972. № 10.
13. *Zervas L., Borovas D., Gazis E.* // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. № 22. P. 3660—3666.

Поступила в редакцию
20.I.1989

После доработки
25.XII.1989

Sh. Kh. KHALIKOV, M. I. ISMAILOV, A. N. SHAHMATOV
SYNTHESIS OF HEPTADECAPEPTIDE (143—159), A FRAGMENT
OF VP₁ PROTEIN OF A₁₂ FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

I. SYNTHESIS OF FRAGMENTS (143—145), (146—148), (149—152), (153—155)
AND (156—159)

V. I. Lenza Tajik State University, Dushanbe

The title peptides were synthesized by classical methods of peptide chemistry, using mixed anhydrides, activated esters, and carbodiimide condensations.