



УДК 577.112.6

© 1994 Ш. Х. Халиков,  
С. В. Алиева, С. Г. Ашууров

СИНТЕЗ НОВЫХ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА VP<sub>1</sub> ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА A<sub>22</sub>.  
СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ 134—139, 134—145, 140—145,  
150—155, 150—159

*Таджикский государственный университет, Душанбе*

Классическими методами пептидной химии синтезированы фрагменты пептидов аминокислотной последовательности (134—145) и (150—159) белка VP<sub>1</sub> вируса ящура типа A<sub>22</sub>. Олигопептиды получали блочной конденсацией, используя метод смешанных ангидридов (изобутилхлорформиат). Конечные продукты охарактеризованы данными аминокислотного анализа после очистки их на ВЭЖХ. Синтезированные пептиды конъюгировали с сукцинилизированным BSA с помощью DCC и с синтетическим полиэлектролитом, сополимером NA, содержащим N-гидроксисукцинимидные группы. Полученные конъюгаты в смеси с ПАФ использовали для иммунизации морских свинок. Образовавшиеся антипептидные антитела проявляли вируснейтрализующие свойства.

Вирус ящура, аутовиром из семейства Picornaviridae, принадлежит к особо опасным острым контагиозным заболеваниям парнокопытных животных. Как и все пикорнавирусы, вирус ящура представлен одной молекулой односторонней РНК и 60 копиями каждого из четырех структурных полипептидов (VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub>, VP<sub>4</sub>).

Борьба с ящуром проводится несколькими способами, особое место среди которых занимает вакцинопрофилактика. Применяемые в настоящее время для этой цели вакцины, приготовленные на основе инактивированного вируса, считаются наиболее эффективными средствами специфической профилактики этого заболевания. Тем не менее всесторонняя практика производства и использования показала определенные недостатки подобных вакцин. Одним из таких недостатков является неполная инактивация вируса, следствием чего может быть возникновение очагов вспышек ящура при вакцинации животных. Кроме того, традиционные вакцины в большинстве случаев являются смесью различных веществ с большим количеством балластных и высокотоксичных примесей из микробных клеток и питательной среды. В результате этого после прививки у животных могут возникнуть тяжелые побочные необратимые реакции.

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

Принятые сокращения: ONp — пара-нитрофенилокси, Nps — орто-нитрофенилсульфенил, BSA — сывороточный альбумин быка, Pfp — пентафторфенил, NA — сополимер винилпирролидона с акриловой кислотой, ПАФ — полный адьювант Фрейнда, DMSO — диметилсульфоксид, THF — тетрагидрофуран, KLH — гемоглобин улитки, НАФ — неполный адьювант Фрейнда, DCNA — дициклогексилламин.

эти причины создают серьезные трудности в эффективном использовании существующих вакцин.

Одним из подходов для решения задачи по созданию противоящурных вакцин нового поколения, которые могли бы полностью или частично устранить вышеперечисленные недостатки, является химический синтез олигопептидов, имитирующих антигенные детерминанты нативного белка вируса и моделирующих в составе конъюгатов их пространственную структуру.

В ряде работ [1—3] приводятся факты, что в нейтрализацию цельного вируса вовлечены три антигенные области из капсидного белка VP<sub>1</sub> вируса ящура, причем одна из них, аминокислотная последовательность которой еще точно не установлена, ответственна за взаимодействие с рецепторами соответствующих клеток. Две другие области, которые вовлечены во взаимодействие с антителами, изучены более детально; установлены их аминокислотные последовательности, соответствующие пептидным фрагментам 141—160 и 200—213. Было также показано, что синтетические пептиды, имитирующие антигенные области белка VP<sub>1</sub> вируса ящура, способны защищать животных от заражения данным вирусом как в свободном виде, так и в виде конъюгатов с высокомолекулярными носителями [4—8].

Поскольку в странах СНГ, и особенно в Таджикистане, одним из самых распространенных типов вируса ящура является вирус типа A<sub>22</sub>, исследования, направленные на изучение его антигенной структуры, представляют особый интерес.

Цель данной работы — синтез фрагментов 134—145 и 150—159 белка VP<sub>1</sub> вируса ящура типа A<sub>22</sub> с последовательностью H-Gly-Lys-Tyr-Ser-Ala-Gly-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly-OH (VP<sub>1</sub>-(134—145)) и H-Leu-Ala-Ala-Arg-Val-Ala-Lys-Gln-Leu-Pro-OH (VP<sub>1</sub>-(150—159)) соответственно и дальнейшее изучение их антигенных и иммуногенных свойств.

При синтезе фрагмента 134—145 остаток метионина-141 был заменен лейцином с целью упрощения синтеза, так как, по данным работы [4], такая замена не влияет на иммуногенные свойства пептида.

Выбор таких последовательностей из иммунодоминантного района (130—160) белка VP<sub>1</sub> вируса ящура, содержащих вируснейтрализующий В-эпитоп, а также Т-эпитоп, был сделан на основе анализа работ по изучению антигенной структуры вируса (например, [9]), а также антигенных и иммуногенных свойств синтетических пептидов [10, 11].

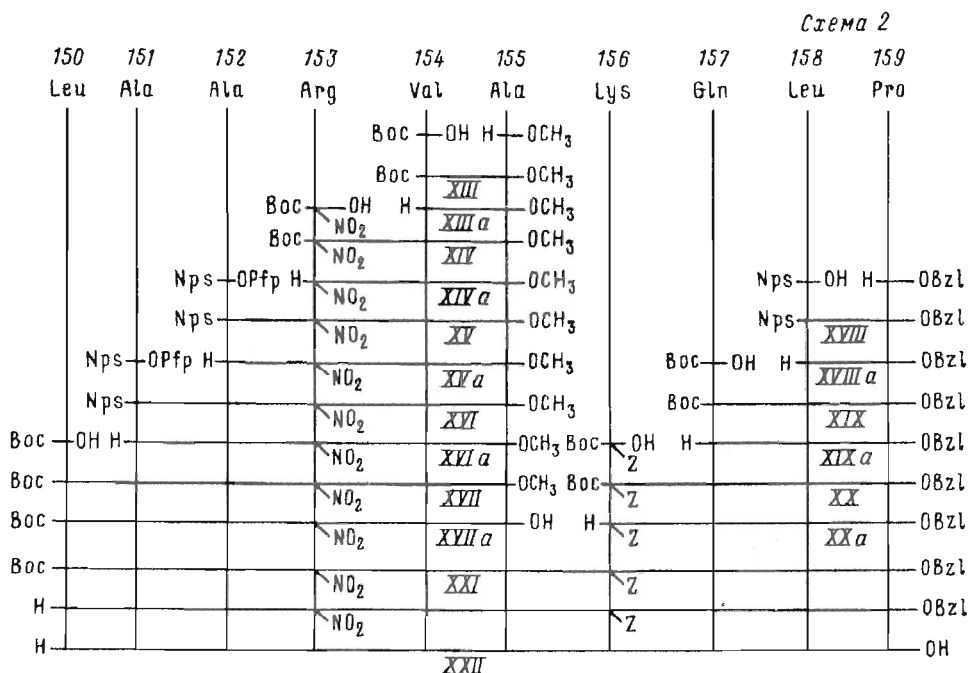
В работе [12] был проведен теоретический анализ антигенной структуры белка VP<sub>1</sub> вируса ящура штамма A<sub>22</sub> на основе исследования профилей гидрофильности, акрофильности, антигенности, а также вероятности местонахождения α-спиральных участков и β-изгибов. Было показано, что наиболее вероятные антигенные детерминанты основного района расположены на участке 131—149.

В работах [7, 8, 12, 13] сообщалось о синтезе и иммуногенных свойствах фрагментов 131—139, 131—149, 140—149, 90—98, 10—24, 50—69, 136—152, 175—189, 197—213, а также их конъюгатов с KLH. Оказалось, что иммуногенными свойствами обладают пептиды, отвечающие участкам 131—149, 140—149, 136—152, 197—213, причем пептиды 136—152 и 131—149 обладали протективными эффектами как в виде конъюгата с KLH, так и в свободном виде, остальные фрагменты — только в виде конъюгатов.

Синтетические пептиды конъюгировали сукцинилированным BSA и полиэлектролитом NA, являющимся сополимером поливинилпирролидона с акриловой кислотой, по методике [14].

Пептиды VP<sub>1</sub>-(134—145) и VP<sub>1</sub>-(150—159) были синтезированы классическими методами пептидной химии. Для блокирования боковых функциональных групп в качестве постоянной защиты использовали бензильную (Bzl) (для остатков Ser и Tyr) и бензилоксикарбонильную (Z) (для остатков Lys) группы, гуанидиниевые группы остатков аргинина были защищены нитрогруппой, устойчивой в кислых условиях удаления временных защитных групп. α-COOH-группы превращали в





Синтез фрагмента 150—159 белка VP<sub>1</sub> вируса ящура тила A<sub>22</sub>

Поскольку С-концевым остатком фрагмента 150—155 является аланин, имеющаяся в этом случае опасность рацемизации уменьшалась путем тщательного соблюдения «условий Андерсона» [15] и добавлением 1-гидроксibenзтриазола. Синтез фрагмента 150—155 был осуществлен путем наращивания пептидной цепи с С-конца методом смешанных ангидридов или методом активированных эфиров (соед. XV, XVI, схема 2). Пентафторфениловый эфир Nps-Ala-OPfp был синтезирован с использованием трансэтерифицирующего реагента дипентафторфенилкарбоната. Полученные таким образом активированные эфиры использовали для реакции конденсации без выделения продукта из реакционной смеси и дополнительной очистки. Фрагмент 156—159 был синтезирован путем ступенчатого наращивания пептидной цепи начиная с С-конца карбодимидным методом (соед. XVIII) и методом смешанных ангидридов (соед. XIX и XX).

Временные Вос-, Nps-защитные группы удаляли действием HCl в уксусной кислоте или этилацетате. Омыление метилового эфира осуществляли действием щелочи на метанольный раствор пептида (XVII). Полное деблокирование фрагментов 134—145 и 150—159, а также промежуточных защищенных гексапептидов 134—139, 140—145 и 150—155 осуществляли каталитическим гидрированием их хлоргидратов в муравьиной кислоте в присутствии Pd/C. Реакция гидрирования больших пептидов (XII, XXII) протекала медленно и не до конца. Поэтому, чтобы обеспечить протекание реакции на 80% и более, было необходимо проводить гидрирование в течение 6—7 сут и менять катализатор 2—3 раза. Предварительную очистку продуктов гидрирования осуществляли переосаждением из метанола эфиром. Затем очистку пептидов (XII) и (XXII) осуществляли ВЭЖХ на полу-препаративной обращенно-фазной колонке при градиенте концентрации метанола в 0,2% CF<sub>3</sub>COOH.

Для иммунологических исследований использовали конъюгаты пептидов VP<sub>1</sub>- (134—145) (XII) и VP<sub>1</sub>- (150—159) (XXII) с BSA и NA при молярном соотношении носитель — пептид 1 : 30. Конъюгирование с NA проводили путем непосредственного смешивания пептида и активированного полимера [14]. Конъюгаты на основе BSA получали карбодимидным методом в DMF [14]. Степень конъюгации

Полученные результаты при конъюгировании

Конъюгат фрагментов белка VP <sub>1</sub>	Масса конъюгата, мг	Степень конъюгации	
		Эпитопная плотность, моль пептида/моль носителя	Содержание пептида в конъюгате, мг пептида/мг носителя
(150—159)—BSA	42,4	23	0,17
(150—159)—NA	42,7	37	0,28
(134—145)—BSA	47,3	6	0,085
(134—145)—NA	12,0	17	0,17
(143—159)—BSA	45	17	0,29
(143—159)—NA	10,6	15	0,23

Таблица 2

Протективный эффект, проявляемый конъюгатами пептидов

Конъюгат	Тип вируса	T <sub>1</sub> *	T <sub>2</sub> **	Протективный эффект**		Число заболевших/число зараженных
				число защищенных/число зараженных	%	
VP <sub>1</sub> -(143—159)—BSA	A <sub>12</sub>	2,1	0,84	0/6	0	6/6
VP <sub>1</sub> -(143—159)—NA	»	3,1	1,54	3/6	50	6/6
VP <sub>1</sub> -(134—145)—BSA	A <sub>22</sub>	2,1	0,84	2/6	33	6/6
VP <sub>1</sub> -(134—145)—NA	»	2,1	1,25	0/3	0	3/3
VP <sub>1</sub> -(150—159)—BSA	»	3,0	2,21	3/6	50	6/6
VP <sub>1</sub> -(150—159)—NA	»	3,0	1,54	3/6	50	6/6

\* Ig (титр антипептидных антител).

\*\* log<sub>2</sub> (титр вируснейтрализующих антител).

Первичную иммунизацию осуществляли конъюгатами пептидов в смеси с ПАФ в дозе 200 мг пептида на одно животное. Вторичную иммунизацию проводили через 42 сут в той же дозе, но в сочетании с НАФ. Первичную и вторичную иммунизацию животных конъюгатами пептидов с NA проводили без адьюванта Фрейнда. Иммунизацию проводили через 55 сут вирусом ящура A<sub>12</sub> в дозе 200 ИД<sub>50</sub>.

определяли фотометрически по содержанию аргинина в образцах [16], а также по данным аминокислотного анализа. Данные о конъюгатах приведены в табл. 1.

Протективный эффект конъюгатов фрагментов 134—145 (XII) и 150—159 (XXII), а также конъюгатов с BSA и NA синтезированного ранее [17] фрагмента 143—159 белка VP<sub>1</sub> вируса ящура типа A<sub>12</sub> определяли на морских свинках\*. Результаты проведенных исследований (табл. 2) свидетельствуют, что в случае фрагмента 143—159 белка VP<sub>1</sub> вируса ящура типа A<sub>12</sub> протективный эффект проявлял конъюгат пептида с NA, тогда как иммунизация конъюгатом с BSA в присутствии ПАФ не приводила к защите животных. Вероятно, этот эффект связан с иммуностимулирующим действием сополимера NA.

\* Из-за недостаточного количества вируса A<sub>22</sub> исследование проводилось перекрестно с вирусом A<sub>12</sub>. Результаты исследования с вирусом A<sub>22</sub> будут сообщены отдельно.



	134											145
A <sub>12</sub>	Asn	Lys	Tyr	Ser	Phe	Asn	Tyr	Ser	Gly	Val	Arg	Gly
A <sub>22</sub>	Gly	-	-	-	Ala	Gly	Gly	Met	-	Arg	-	-
	150											159
A <sub>12</sub>	Leu	Ala	Pro	Arg	Val	Ala	Arg	Gln	Leu	Pro		
A <sub>22</sub>	-	-	Ala	-	-	-	Lys	-	-	-		

Сравнение аминокислотных последовательностей 134—145 и 150—159 белка VP<sub>1</sub> вируса ящура типов A<sub>12</sub> и A<sub>22</sub>. Для A<sub>22</sub> приведены только отличающиеся остатки

Интересно, что протективный эффект конъюгатов пептидов VP<sub>1</sub>-(134—145) (XII) и VP<sub>1</sub>-(150—159) (XXII) вируса ящура типа A<sub>22</sub> проявляется против заражения вирусом типа A<sub>12</sub>, причем защитными свойствами обладают оба конъюгата пептида (XXII), тогда как в случае фрагмента 134—145 — только конъюгат пептида с BSA. Это, по нашему мнению, можно объяснить тем, что аминокислотная последовательность участка 150—159 у вируса ящура типов A<sub>12</sub> и A<sub>22</sub> различается только двумя аминокислотными остатками (рисунок), в то время как на участке 134—145 аминокислотные последовательности различаются 6 аминокислотными остатками.

### Экспериментальная часть

В работе использовали производные L-аминокислот фирмы Reanal (Венгрия). ТСХ проводили на хроматографических пластинках Silufol (ЧСФР) и Kieselgel-60 на стеклянной подложке № 5724 (Merck, Германия) в следующих системах растворителей: хлороформ — этилацетат — циклогексан, 4 : 5 : 1 (А); толуол — диоксан — циклогексан — этанол, 10 : 6 : 3 : 1 (Б); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 18 : 2 : 1 (В); хлороформ — метанол — циклогексан, 70 : 15 : 15 (Д); втор-бутанол — пиридин — вода, 100 : 45 : 5 (Е); хлороформ — метанол — пиридин — циклогексан, 32 : 4 : 2 : 1 (Ж); *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 4 : 1 : 1 (З); *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 1 : 1 : 1 (И); пиридин — уксусная кислота — вода — этилацетат, 20 : 6 : 11 : 90 (К). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидрина и реагента Cl<sub>2</sub> — бензидин — KI. Гидрирование пептидов проводили над Pd/C фирмы Merck (Германия) (5 и 10% по весу).

Для колоночной хроматографии использовали силикагель марки L 100/160 (Chemapol, ЧСФР). Удельное оптическое вращение определяли на поляриметре Polomat (Германия). 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-735 (Япония) и Biotronic-5001 (Германия). ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex-340 (Beckman, США) с использованием обращенно-фазной колонки Ultrasphere-ODS (5 мкм, 10×250 мм) и детектора Spectroflow-757 (Kratos, США). В работе использовали амберлит IRA-401 и дауэкс-50W×8 (100—200 меш, США).

Получение конъюгатов пептидов с BSA и NA описано в работе [14].

Растворители удаляли на роторном испарителе при 40—50° С (если не указана температура). Температуры плавления определяли на приборе Voetius (Германия).

Z-Ala-Gly-OCH<sub>3</sub> (D). К охлажденному до -15° С раствору 7 г (31,36 ммоль) Z-Ala-OH, 5 г (39,8 ммоль) HCl·H-Gly-OCH<sub>3</sub>, 3,8 г (33,0 ммоль) N-гидроксисукцинимид, 3,7 мл (33,0 ммоль) N-метилморфолина в 120 мл этилацетата добавляли 7,3 г (35,4 ммоль) DCC и перемешивали 2 ч при -20→0° С и 1 ч

при  $0 \rightarrow 20^\circ \text{C}$  и оставляли на 16 ч при  $20^\circ \text{C}$ . Добавляли в реакционную смесь 4 мл 50%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и перемешивали 1 ч, выпавшую N, N-дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат последовательно промывали 1 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , водой, 0,5 М  $\text{NaHCO}_3$  и снова водой до нейтральной реакции. Этилацетатный слой сушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали, остаток осаждали из ацетона эфиром. Получали 6,18 г (70%) кристаллического продукта. Т. пл.  $100\text{--}102^\circ \text{C}$ .  $R_f$  0,34 (А), 0,52 (В), 0,67 (Г).  $[\alpha]_D^{20} -16,52^\circ$  (с 1,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

*H-Ala-Gly-OCH<sub>3</sub> (Ia)*. К раствору 5,2 г (17,7 ммоль) N $\alpha$ -Z-пептида (I) в 150 мл метанола добавляли палладий на угле (Pd/C) и 4 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и выдерживали 4 ч при  $20^\circ \text{C}$ . Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток сушили под вакуумом. Полученный маслообразный продукт растворяли в 30 мл DMF, добавляли 2,5 г (21,7 ммоль) N-гидроксисукцинимида, охлаждали до  $-25^\circ \text{C}$  и добавляли 1,8 мл (16,0 ммоль) N-метилморфолина.

*Woc-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OCH<sub>3</sub> (II)*. 9 г (18,2 ммоль) Woc-Ser(Bzl)-OH·DCNA освобождали от DCNA действием 20 мл 1 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в 200 мл этилацетата. Этилацетатный раствор сушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель упаривали. Полученный маслообразный Woc-Ser(Bzl)-OH растворяли в 50 мл этилацетата, охлаждали до  $-25^\circ \text{C}$ , добавляли 1,83 мл (16,3 ммоль) N-метилморфолина и 2,45 мл (18,7 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 3 мин добавляли раствор соединения (Ia). Перемешивание продолжали 40 мин при  $30 \rightarrow -10^\circ \text{C}$ , 1 ч при  $-10 \rightarrow 20^\circ \text{C}$  и 3 ч при  $20^\circ \text{C}$ , оставляли на 16 ч при  $20^\circ \text{C}$ . Растворитель упаривали, остаток растворяли в 150 мл этилацетата, раствор последовательно промывали 0,4 М лимонной кислотой, водой, 0,5 М  $\text{NaHCO}_3$  и снова водой до нейтральной реакции. Этилацетатный раствор сушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель упаривали. Остаток дважды переосаждали из хлороформа эфиром. Выход кристаллического продукта 3,57 г (46,0%). Т. пл.  $144\text{--}146^\circ \text{C}$ .  $R_f$  0,23 (А), 0,52 (В), 0,51 (Д).  $[\alpha]_D^{20} +3,92^\circ$  (с 1,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

*HCl·H-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OCH<sub>3</sub> (IIa)*. К раствору 2,18 г (4,75 ммоль) пептида (II) в 8 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$  добавляли 10 мл 3 н. HCl в уксусной кислоте и выдерживали 30 мин при  $20^\circ \text{C}$ . Растворитель упаривали, остаток сушили в вакууме. Полученный аморфный продукт растворяли в 20 мл DMF, охлаждали до  $-25^\circ \text{C}$ , прибавляли 0,56 мл (5 ммоль) N-метилморфолина.

*Woc-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OCH<sub>3</sub> (III)*. Раствор 2,23 г (5,7 ммоль) Woc-Tyr(Bzl)-OH и 0,67 мл (5,98 ммоль) N-метилморфолина в 20 мл DMF охлаждали до  $-25^\circ \text{C}$  и добавляли 0,78 мл (5,95 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 3 мин добавляли раствор соединения (IIa). Перемешивание продолжали 1 ч при  $-25 \rightarrow -10^\circ \text{C}$ , 1 ч при  $-10 \rightarrow 0^\circ \text{C}$ , 2 ч при  $20^\circ \text{C}$  и оставляли на 16 ч при  $20^\circ \text{C}$ . Растворитель упаривали, остаток растворяли в 200 мл этилацетата, обрабатывали как описано для пептида (II) и дважды переосаждали из метанола эфиром. Выход кристаллического продукта (III) 2,66 г (77%). Т. пл.  $164\text{--}167^\circ \text{C}$ .  $R_f$  0,35 (В), 0,60 (В), 0,63 (Г).  $[\alpha]_D^{20} +7,007^\circ$  (с 1,3,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

*HCl·H-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OCH<sub>3</sub> (IIIa)* получали аналогично соединению (IIa) исходя из 1,9 г (2,62 ммоль) соединения (III). Полученное пенообразное гигроскопичное вещество растворяли в 30 мл DMF, охлаждали до  $-25^\circ \text{C}$  и добавляли 0,31 мл (2,77 ммоль) N-метилморфолина.

*Woc-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OCH<sub>3</sub> (IV)* получали аналогично соединению (III) исходя из 2 г (3,54 ммоль) Woc-Lys(Z)-OH·DCNA, 0,376 мл (3,36 ммоль) N-метилморфолина, 0,44 мл (3,36 ммоль) изобутилхлорформиата и соединения (IIIa). После переосаждения из метанола получено 1,65 г (63%) продукта (IV). Т. пл.  $154\text{--}158^\circ \text{C}$ .  $R_f$  0,26 (Б), 0,62 (Г), 0,48 (Д).  $[\alpha]_D^{20} +3,45^\circ$  (с 1,  $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ , 4 : 1).

*Woc-Gly-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OCH<sub>3</sub> (V)* получали по методике для (IV) исходя из 1,2 г (6,85 ммоль) Woc-Gly-OH, 0,72 мл (6,43 ммоль) N-метилморфолина, 0,9 мл (6,87 ммоль) изобутилхлорформиата и раствора соединения

(IVa), полученного из 4,48 г (4,53 ммоль) соединения (IV) как описано для (IIa). Выход 2,55 г (55,98%); аморфное вещество.  $R_f$  0,38 (B), 0,47 (D), 0,91 (И).  $[\alpha]_D^{20} -18,29^\circ$  ( $c$  1,3, DMF).

*Woc-Gly-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OH* (Va). К раствору 2,22 г (2,12 ммоль) соединения (V) в 150 мл метанола добавляли 5 мл 1 н. NaOH в течение 1 ч. Перемешивание продолжали еще 3 ч. К реакционной смеси добавляли 8 г дауэкса 50W × 8 (H<sup>+</sup>-форма) и перемешивали 30 мин. Катионит отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха. Остаток дважды пересаждали из метанола эфиром. Выход аморфного продукта (Va) 1,89 г (86,3%).  $R_f$  0,44 (D), 0,63 (E), 0,25 (Ж), 0,97 (З).  $[\alpha]_D^{20} -8,299^\circ$  ( $c$  1,3, CH<sub>3</sub>OH).

*Z-Leu-Gly-OCH<sub>3</sub>* (VI). К суспензии 1,12 г (8,9 ммоль) HCl·H-Gly-OCH<sub>3</sub>, 3,23 г (8,9 ммоль) Z-Leu-OSu в 20 мл диоксана добавляли 1,3 мл (6,93 ммоль) триэтиламина и перемешивали 1,5 сут при 20° С. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 200 мл этилацетата, последовательно промывали 0,4 М лимонной кислотой, водой, 0,5 М NaHCO<sub>3</sub> и водой до нейтральной реакции. Этилацетатный слой сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, осушитель отфильтровывали, растворитель упаривали. Остаток кристаллизовали из эфира. Выход 1,63 г (54,3%). Т. пл. 92—93° С.  $R_f$  0,64 (A), 0,53 (B), 0,56 (Г).  $[\alpha]_D^{20} -24,95^\circ$  ( $c$  1, CH<sub>3</sub>OH).

*H-Leu-Gly-OCH<sub>3</sub>* (VIa). К раствору 3,2 г (9,5 ммоль) Z-Leu-Gly-OCH<sub>3</sub> в 60 мл метанола добавляли 3 мл CH<sub>3</sub>COOH, Pd/C и гидрировали 5 ч до полного удаления Z-группы (контроль ТСХ). Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток сушили под вакуумом. Полученный пенообразный продукт растворяли в 30 мл DMF, охлаждали до -25° С, добавляли 1,07 мл (9,55 ммоль) N-метилморфолина.

*Woc-Gly-Leu-Gly-OCH<sub>3</sub>* (VII). К охлажденному до -25° С раствору 2,22 г (12,7 ммоль) Woc-Gly-OH и 1,27 мл (11,3 ммоль) N-метилморфолина в 30 мл DMF добавляли 1,71 мл (13,05 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 10 мин к реакционной смеси добавляли раствор соединения (VIa). Перемешивание продолжали 1 ч при -25 → -10° С, 1 ч при -10 → 0° С, 2 ч при 0 → 20° С. Растворитель упаривали. Остаток кристаллизовали из эфира. Выход 2,75 г (80,12%). Т. пл. 142—144° С.  $R_f$  0,16 (A), 0,53 (B), 0,39 (D).  $[\alpha]_D^{20} -16,5^\circ$  ( $c$  1, CH<sub>3</sub>OH).

*Woc-Gly-Leu-Gly-OH* (VIIa) получали из 3,6 г (10 ммоль) соединения (VII) в 30 мл метанола как описано для (Va). Выход 3,29 г (95,25%); аморфное вещество.  $R_f$  0,32 (B), 0,26 (Г), 0,53 (E).  $[\alpha]_D^{20} -21,48^\circ$  ( $c$  1,3, CH<sub>3</sub>OH).

*Woc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OCH<sub>3</sub>* (VIII). К охлажденному до -25° С раствору 6,95 г (21,7 ммоль) Woc-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH в DMF добавляли 2,2 мл (16,8 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 3 мин добавляли охлажденный раствор 3,3 г (21,7 ммоль) 6HCl·H-Gly-OCH<sub>3</sub> в 50 мл DMF, содержащий 2,65 мл (27,7 ммоль) N-метилморфолина. Перемешивание продолжали 2 ч при -25 → -15° С, 1 ч при -15 → 0° С, 2 ч при 0 → 20° С и оставляли на 16 ч при 20° С. Растворитель упаривали, остаток обрабатывали как описано для (II) и пересаждали из метанола эфиром, кристаллизовали из хлороформа. Выход 6,6 г (77,68%). Т. пл. 141—142° С.  $R_f$  0,31 (Г), 0,54 (D), 0,80 (E), 0,48 (Ж).  $[\alpha]_D^{20} -6,8^\circ$  ( $c$  1, CH<sub>3</sub>OH).

*HCl·H-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OCH<sub>3</sub>* (VIIIa) получали из 4 г (10,25 ммоль) пептида (VIII) как описано для (IIa).

*Woc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OCH<sub>3</sub>* (IX) получали из 3,83 г (12,0 ммоль) Woc-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH и соединения (VIIIa) как описано для (VIII). Растворитель упаривали, остаток растворяли в 300 мл этилацетата и промывали насыщенным раствором Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Этилацетатный слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, осушитель отфильтровывали, растворитель упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 20 мл системы Г и наносили на колонку (2 × 42 см) с силикагелем, уравновешенным хлороформом. Колонку элюировали в градиенте CHCl<sub>3</sub> — CH<sub>3</sub>OH — CH<sub>3</sub>COOH от соотношения 18 : 2 : 1 до 9 : 2 : 1 (около 300 мл). Собирали фракции,



содержащие основной продукт (контроль ТСХ). Растворитель упаривали, остаток осаждали из этилацетата эфиром. Выход 2,9 г (48,9); аморфное вещество.  $R_f$  0,22 (Д), 0,60 (З), 0,46 (И).  $[\alpha]_D^{20} - 25,41^\circ$  (с 1,3,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

$\text{HCl} \cdot \text{H-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Gly-OCH}_3$  (IXa) получали из 1,2 г (2,2 ммоль) пептида (IX) как описано для (IIIa).

$\text{Hoc-Gly-Leu-Gly-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Gly-OCH}_3$  (X). К охлажденному до  $-25^\circ \text{C}$  раствору 0,7 г (2,0 ммоль) соединения (VIIa) и 0,227 мл (2,0 ммоль) N-метилморфолина в 10 мл DMF добавляли 0,265 мл (2,0 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 3 мин добавляли раствор соединения (IXa). Далее реакцию и обработку вели аналогично получению соединения (VII). После переосаждения из метанола эфиром получено 0,85 г (51,8%). Т. пл.  $148\text{--}150^\circ \text{C}$ .  $R_f$  0,77 (Е), 0,51 (З), 0,38 (И).

$\text{HCl} \cdot \text{HGly-Leu-Gly-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Gly-OCH}_3$  (Xa). К раствору 0,63 г (0,8 ммоль)  $\text{Hoc-Gly-Leu-Gly-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Gly-OCH}_3$  в 4 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$  добавляли 5 мл 3 н.  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$  и выдерживали 40 мин при  $20^\circ \text{C}$ . Растворитель упаривали, остаток переосаждали из метанола эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме. Полученный хлоридрат (Xa) (0,51 г) растворяли в 10 мл DMF, добавляли 0,05 мл (0,45 ммоль) N-метилморфолина и охлаждали до  $-25^\circ \text{C}$ .

$\text{Hoc-Gly-Lys}(\text{Z})\text{-Tyr}(\text{Bzl})\text{-Ser}(\text{Bzl})\text{-Ala-Gly-Gly-Leu-Gly-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Gly-OCH}_3$  (XI). К охлажденному до  $-25^\circ \text{C}$  раствору 0,4 г (0,38 ммоль) соединения (Va) и 0,05 мл (0,45 ммоль) N-метилморфолина в 5 мл DMF добавляли 0,058 мл (0,44 ммоль) изобутилхлорформиата и через 2,5 мин раствор соединения (Xa). Перемешивание продолжали 2 ч при  $-25 \rightarrow -10^\circ \text{C}$ , 1 ч при  $-10 \rightarrow 0^\circ \text{C}$ , 2 ч при  $20^\circ \text{C}$  и оставляли на 16 ч при  $20^\circ \text{C}$ . К реакционной смеси добавляли 3 мл DMSO и 2 г амберлита-201, перемешивали 30 мин. Катионит отфильтровывали, к фильтрату добавляли 2 г дауэкса 50W $\times$ 8, перемешивали 30 мин. Катионит отфильтровывали, фильтрат концентрировали и разбавляли этилацетатом. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом. Выход 0,45 г (59,2%); аморфное вещество.  $R_f$  0,77 (Е), 0,68 (К).  $[\alpha]_D^{20} - 23,785^\circ$  (с 0,8, DMSO—DMF, 1:4).

$\text{Hoc-Gly-Lys}(\text{Z})\text{-Tyr}(\text{Bzl})\text{-Ser}(\text{Bzl})\text{-Ala-Gly-Gly-Leu-Gly-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Gly-OH}$  (XIa). К раствору 1,55 г (0,67 ммоль) соединения (XI) в 4 мл DMSO в течение 30 мин при перемешивании прибавляли порциями 1,3 мл 1 н. NaOH. Перемешивание продолжали 1,5 ч. Реакционную смесь подкисляли добавлением 1,65 мл  $\text{NaHSO}_4$  и разбавляли водой. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили под вакуумом. Переосаждали из DMSO водой, осадок отфильтровывали, сушили в вакууме. Выход 1,07 г (93,86%), аморфное вещество.  $R_f$  0,68 (Е), 0,19 (К), 0,0 (Д).  $[\alpha]_D^{20} - 22,9^\circ$  (с 1, DMF).

$\text{HCl} \cdot \text{H-Gly-Lys-Tyr-Ser-Ala-Gly-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly-OH}$  (XII). К раствору 0,28 г (0,617 ммоль) соединения (XIa) в 2 мл муравьиной кислоты добавляли 2 мл 2 н.  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$ , выдерживали 45 мин при  $20^\circ \text{C}$ . Растворитель упаривали, остаток переосаждали из муравьиной кислоты эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили под вакуумом. Полученный продукт растворяли в 15 мл муравьиной кислоты, добавляли Pd/C и гидрировали 2 сут. Катализатор отфильтровывали, к фильтрату добавляли новую порцию катализатора и продолжали гидрирование 3 сут. Катализатор отфильтровывали и продолжали гидрирование с новой порцией катализатора еще 2 сут. После удаления катализатора растворитель упаривали, остаток переосаждали из метанола эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили под вакуумом. Полученный продукт растворяли в 0,2%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  и очищали с помощью ВЭЖХ. Фракцию, соответствующую основному пику, лиофильно сушили. Выход 0,14 г.  $[\alpha]_D^{20} - 57,65^\circ$  (с 1,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Аминокислотный анализ: Gly 4,5 (5), Lys 0,75 (1), Tyr 0,88 (1), Ser 0,78 (1), Ala 1,08 (1), Leu 1,13 (1), Arg 1,82 (2).

$\text{Hoc-Val-Ala-OCH}_3$  (XIII). К раствору 15,0 г (37,6 ммоль)  $\text{Hoc-Val-OH} \cdot \text{DCHA}$  в 150 мл эфира добавляли 100 мл 0,4 М раствора лимонной кислоты. После сушки и удаления растворителя маслообразный остаток  $\text{Hoc-Val-OH}$  растворяли

в 100 мл THF, добавляли 4,21 мл (37,6 ммоль) N-метилморфолина и охлаждали до  $-25^{\circ}\text{C}$ . К полученному охлажденному раствору добавляли 4,92 мл (37,56 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 3 мин добавляли охлажденный до  $-25^{\circ}\text{C}$  раствор 5,76 г (41,26 ммоль) хлоргидрата метилового эфира аланина в 50 мл DMF, содержащего 4,62 мл (41,26 ммоль) N-метилморфолина. Перемешивание продолжали 3 ч при  $-25 \rightarrow -10^{\circ}\text{C}$ , 1 ч при  $-1 \rightarrow 20^{\circ}\text{C}$ , обрабатывали аналогично соединению (II). Общий выход (XIII) 8,48 г (74,5%). Т. пл.  $140-141^{\circ}\text{C}$ .  $R_f$  0,69 (Б), 0,63 (Г), 0,63 (Д), 0,74 (В), 0,87 (Е).  $[\alpha]_D^{20} -33,67^{\circ}$  (с 1,  $\text{CHCl}_3-\text{CH}_3\text{OH}$ , 4 : 1).

*HCl·H-Val-Ala-OCH<sub>3</sub>* (XIIIa). К раствору 3,03 г (10,0 ммоль) соединения (XIII) в 10 мл уксусной кислоты добавляли 12 мл 3 н. HCl в этилацетате. Выдерживали 30 мин при  $20^{\circ}\text{C}$ , растворитель удаляли при  $20^{\circ}\text{C}$ . Остаток растворяли в метаноле, метанол удаляли и остаток сушили в вакууме. Гигроскопичный продукт растворяли в 35 мл THF, добавляли 1,12 мл (10 ммоль) N-метилморфолина и охлаждали до  $-25^{\circ}\text{C}$ .

*Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Ala-OCH<sub>3</sub>* (XIV). 3,52 г (11,03 ммоль) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH растворяли в горячем THF в присутствии 1,23 мл (11 ммоль) N-метилморфолина. Раствор охлаждали до  $-25^{\circ}\text{C}$ , при перемешивании прибавляли 1,44 мл (11 ммоль) изобутилхлорформиата и через 3 мин раствор (XIIIa). Реакционную смесь перемешивали 2 ч при  $-25 \rightarrow -10^{\circ}\text{C}$ , 2 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ . Растворитель упаривали, остаток растворяли в этилацетате в присутствии воды. Органический слой промывали последовательно 0,4 М лимонной кислотой, водой, 0,5 М NaHCO<sub>3</sub> и снова водой. Растворитель сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали, остаток сушили в вакууме при  $50^{\circ}\text{C}$ . Остаток дважды кристаллизовали из горячего этилацетата путем охлаждения и разбавляли эфиром. Выход 3,8 г (75,5%). Т. пл.  $182-183,5^{\circ}\text{C}$ .  $R_f$  0,32 (Г), 0,40 (Д), 0,24 (В), 0,85 (Е).  $[\alpha]_D^{20} -37,47^{\circ}$  (с 1,  $\text{CHCl}_3-\text{CH}_3\text{OH}$ , 4 : 1).

*HCl·H-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Ala-OCH<sub>3</sub>* (XIVa). К раствору 5,11 г (10,1 ммоль) соединения (XIV) в 10 мл уксусной кислоты добавляли 20 мл 3 н. раствора HCl в уксусной кислоте, выдерживали 30 мин при  $20^{\circ}\text{C}$ . Растворитель упаривали, остаток сушили в вакууме. Полученное соединение (XIVa) растворяли в 30 мл DMF, охлаждали до  $0^{\circ}\text{C}$ , добавляли 1,42 мл (1,56 ммоль) триэтиламина.

*Nps-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Ala-OCH<sub>3</sub>* (XV). К раствору 3,0 г (12,2 ммоль) Nps-Ala-OH в 20 мл этилацетата при  $20^{\circ}\text{C}$  добавляли 5,27 г (13,3 ммоль) дипентафторфенилкарбоната, 1,17 мл (9,22 ммоль) триэтиламина и перемешивали 30 мин. Растворитель упаривали. Остаток растворяли в 10 мл DMF, охлаждали до  $0^{\circ}\text{C}$  и к нему добавляли раствор соединения (XIVa). Перемешивали 3 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и оставляли на 16 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ . Раствор концентрировали, разбавляли эфиром. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали эфиром и водой. Продукт сушили в вакууме, пересаждали из метанола этилацетатом. Выход 4,57 г (71,71%). Т. пл.  $189-191^{\circ}\text{C}$ .  $R_f$  0,34 (Г), 0,33 (Д).  $[\alpha]_D^{20} -44,63^{\circ}$  (с 1,3, DMF).

*HCl·H-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Ala-OCH<sub>3</sub>* (XVa). Раствор 4,2 г (6,65 ммоль) соединения (XV) в 50 мл уксусной кислоты с 10 мл 3 н. раствора HCl в этилацетате оставляли при  $5^{\circ}\text{C}$  на 30 мин. Растворитель упаривали до половины объема, разбавляли этилацетатом и выдерживали 20 мин при  $5^{\circ}\text{C}$ . Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, сушили в вакууме. Получали 3,0 г (88,23%) соединения (XVa).

*Nps-Ala-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Ala-OCH<sub>3</sub>* (XVI) получали аналогично соединению (XV) исходя из 3 г (5,8 ммоль) соединения (XVa), 1,42 г (5,8 ммоль) Nps-Ala-OH, 4,02 г (10,2 ммоль) дипентафторфенилкарбоната, 0,83 мл (4,42 ммоль) триэтиламина. Выход 2,42 г (59,02%). Т. пл.  $189-191^{\circ}\text{C}$ .  $R_f$  0,29 (Г), 0,33 (Д).  $[\alpha]_D^{20} -31,73^{\circ}$  (с 0,98, DMF).

*HCl·H-Ala-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Ala-OCH<sub>3</sub>* (XVIa). К раствору 1,88 г (2,67 ммоль) соединения (XVI) в 50 мл уксусной кислоты добавляли 10 мл 3 н. раствора HCl в этилацетате, оставляли на 30 мин при  $0^{\circ}\text{C}$ . Растворитель упаривали, остаток



пересаждали из уксусной кислоты этилацетатом. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, сушили в вакууме. После пересадения из DMF ацетоном соединения (XVIa) (1,54 г, 94,15%) растворяли в 20 мл DMF, добавляли 0,28 мл (2,5 ммоль) N-метилморфолина, охлаждали до  $-25^{\circ}\text{C}$ .

*Woc-Leu-Ala-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Ala-OCH<sub>3</sub>* (XVII). 0,81 г (3,25 ммоль) Woc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O сушили в вакууме 30 мин при  $50^{\circ}\text{C}$ . Полученный Woc-Leu-OH растворяли в 10 мл DMF, добавляли 0,364 мл (3,25 ммоль) N-метилморфолина, охлаждали до  $-25^{\circ}\text{C}$ , добавляли 0,42 мл (3,2 ммоль) изобутилхлорформиата и через 2,5 мин раствор соединения (XVIa). Перемешивание продолжали 1 ч при  $-25 \rightarrow -15^{\circ}\text{C}$ , 1 ч при  $-15 \rightarrow 0^{\circ}\text{C}$ , 2 ч при  $0 \rightarrow 20^{\circ}\text{C}$  и оставляли на 16 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ . К реакционной смеси добавляли 5 г амберлита 40 Å, через 30 мин анионит отфильтровывали, к фильтрату добавляли 5 г даукса 50W × 8, через 30 мин катионит отфильтровывали. Фильтрат концентрировали, разбавляли этилацетоном. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, пересаждали из DMF ацетоном. Выход 0,9 г (44,2%). Т. пл.  $210-212^{\circ}\text{C}$ .  $R_f$  0,31 (Г), 0,37 (Д), 0,70 (Е).  $[\alpha]_D^{20} -27,56^{\circ}$  (с 1, DMF).

*Woc-Leu-Ala-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Ala-OH* (XVIIa). К раствору 0,95 г (1,25 ммоль) соединения (XVII) в 10 мл DMF при перемешивании прибавляли порциями 1,95 мл 1 н. NaOH в течение 1 ч. Перемешивание продолжали еще 2 ч. К реакционной смеси добавляли 5 г даукса 50W × 8 и 10 мл DMF. Через 30 мин катионит отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток сушили под вакуумом. Продукт дважды пересаждали из метанола эфиром. Выход 0,88 г (94,42%). Т. пл.  $192-196^{\circ}\text{C}$ .  $R_f$  0,16 (Г), 0,17 (Д), 0,88 (Е).

*Nps-Leu-Pro-OBzl* (XVIII). К раствору 15,92 г (34,2 ммоль) Nps-Leu-OH·DCNA в 200 мл эфира добавляли 40 мл 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После сушки и удаления растворителя получали 9,9 г Nps-Leu-OH. К раствору 15,06 г (40 ммоль) Tos-OH·H-Pro-OBzl в 50 мл воды прибавляли 5 г NaHCO<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до насыщения. H-Pro-OBzl экстрагировали хлороформом до его исчезновения в водном растворе (контроль ТСХ). Хлороформную вытяжку сушили безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтровали. Фильтрат добавляли к Nps-Leu-OH, упаривали и сушили в вакууме.

Образовавшуюся смесь (17,4 г масла) растворяли в 50 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, охлаждали до  $-15^{\circ}\text{C}$  и при перемешивании прибавляли 8 г (38,83 ммоль) DCC. Перемешивание продолжали 1 ч при  $-15 \rightarrow -5^{\circ}\text{C}$ , 2 ч при  $0^{\circ}\text{C}$ , 1 ч при  $20^{\circ}\text{C}$  и оставляли на 16 ч при  $20^{\circ}\text{C}$ . Прибавляли 5 мл 50% CH<sub>3</sub>COOH, через 30 мин отфильтровывали выпавшую N, N'-дициклогексилмочевину. Фильтрат упаривали, остаток растворяли в этилацетате и последовательно промывали 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, водой, 0,5 М NaHCO<sub>3</sub> и снова водой. Раствор сушили, упаривали, остаток растворяли в 20 мл CCl<sub>4</sub> и наносили на колонку (3 × 50 см) с силикагелем, уравновешенным CCl<sub>4</sub>. Вещества с колонки элюировали CCl<sub>4</sub>, затем CHCl<sub>3</sub>. Собирали хлороформные фракции элюатов, содержащие основной продукт (контроль ТСХ), растворитель упаривали, остаток сушили в вакууме при  $50^{\circ}\text{C}$  и получали 12,54 г (77,8%) густого маслообразного продукта (XVIII).  $R_f$  0,81 (Г), 0,83 (В), 0,86 (Д).  $[\alpha]_D^{20} -12,89^{\circ}$  (с 1, CHCl<sub>3</sub>).

*HCl-H-Leu-Pro-OBzl* (XVIIIa). К охлажденному до  $4^{\circ}\text{C}$  раствору 5,53 г (11,73 ммоль) соединения (XVIII) в 40 мл эфира прибавляли 12 мл 3 н. HCl в этилацетате, выдерживали 10 мин при  $20^{\circ}\text{C}$ , 20 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Растворитель упаривали при  $20^{\circ}\text{C}$ , остаток растворяли в эфире и охлаждали в течение 2 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром до обесцвечивания фильтрата. Осадок пересаждали из хлороформа эфиром, затем из хлороформа этилацетатом. Выход 3,19 г (76,7%). Т. пл.  $158-159^{\circ}\text{C}$ .  $R_f$  0,34 (Д), 0,89 (К).  $[\alpha]_D^{20} -68,54^{\circ}$  (с 1, CH<sub>3</sub>OH).

Полученный продукт растворяли в 20 мл DMF, прибавляли 1 мл (9 ммоль) N-метилморфолина и охлаждали до  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Woc-Gln-Leu-Pro-OBzl* (XIX). К охлажденной до  $-20^{\circ}\text{C}$  смеси раствора 2,66 г (10,79 ммоль) Woc-Gln-OH в 15 мл DMF и 1,2 мл (10,71 ммоль) N-метилморфолина

при перемешивании прибавляли 1,40 мл (10,69 ммоль) изобутилхлорформиата и через 2 мин раствор пептида (XVIIa). Перемешивание продолжали 2 ч при  $-20 \rightarrow -5^\circ \text{C}$ , 2 ч при  $5 \rightarrow 20^\circ \text{C}$  и оставляли на 16 ч при  $20^\circ \text{C}$ . Растворитель упаривали, остаток растворяли в этилацетате в присутствии воды. Органический слой последовательно промывали 0,4 М лимонной кислотой, водой, 0,5 М  $\text{NaHCO}_3$  и снова водой. Раствор сушили, упаривали, остаток растворяли в эфире и осаждали гексаном при охлаждении. Органический слой декантировали, осадок сушили в вакууме. Выход 4,5 г (91,6%),  $R_f$  0,42 (Г), 0,39 (Д), 0,81 (Е).  $[\alpha]_D^{20} -77,42^\circ$  (с 1,  $\text{CHCl}_3$ ).

*HCl·H-Gln-Leu-Pro-OBzl (XIXa)* получали из 2,26 г (4,1 ммоль) соединения (XIX) как описано для (IIa).

*Woc-Lys(Z)-Gln-Leu-Pro-OBzl (XX)*. 2,78 г (4,1 ммоль) *Woc-Lys(Z)-OH·DCHA* освобождали от DCHA в 150 мл этилацетата действием 5,5 мл 1 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . После сушки над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  осушитель удаляли фильтрованием, фильтрат упаривали. Полученный *Woc-Lys(Z)-OH* растворяли в 20 мл THF, добавляли 0,46 мл (4,1 ммоль) N-метилморфолина, охлаждали до  $-25^\circ \text{C}$ , прибавляли 0,62 мл (4,7 ммоль) изобутилхлорформиата и через 2 мин раствор соединения (XIXa). Перемешивание продолжали 1 ч при  $-25 \rightarrow -10^\circ \text{C}$ , 1 ч при  $-10 \rightarrow 0^\circ \text{C}$  и 2 ч при  $20^\circ \text{C}$ . Растворитель упаривали, остаток обрабатывали как описано для (II) и пересаждали вначале из этилацетата эфиром, затем из хлороформа эфиром. Выход 2,28 г (68,14%). Т. пл.  $82-84^\circ \text{C}$ .  $R_f$  0,50 (В), 0,60 (Г).  $[\alpha]_D^{20} -88,945^\circ$  (с 1,3,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

*HCl·H-Lys(Z)-Gln-Leu-Pro-OBzl (XXa)* получали из 1,0 г (1,2 ммоль) пептида (XX) как описано для (IIa). Высушенный в вакууме остаток растворяли в 15 мл DMF, добавляли 0,2 г (1,5 ммоль) 1-гидроксibenзтриазола, 0,13 мл (1,16 ммоль) N-метилморфолина и охлаждали до  $-25^\circ \text{C}$ .

*Woc-Leu-Ala-Ala-Arg(NO\_2)-Val-Ala-Lys(Z)-Gln-Leu-Pro-OBzl (XXI)*. К охлажденному до  $-25^\circ \text{C}$  раствору 0,82 г (1,1 ммоль) соединения (XVIIa), 0,12 мл (1,1 ммоль) N-метилморфолина в 10 мл DMF добавляли 0,14 мл (1,0 ммоль) изобутилхлорформиата и через 2 мин раствор соединения (XXa). Перемешивание продолжали 1 ч при  $-25 \rightarrow -15^\circ \text{C}$ , 1 ч при  $-15 \rightarrow 0^\circ \text{C}$ , 2 ч при  $20^\circ \text{C}$  и оставляли на 16 ч при  $20^\circ \text{C}$ . К реакционной смеси добавляли 5 г амберлита IRA-401, через 30 мин анионит отфильтровывали. К фильтрату добавляли 5 г дауэкса 50W × 8 и через 30 мин катионит отфильтровывали. Фильтрат концентрировали, разбавляли ацетоном, выпавший осадок отфильтровывали, промывали ацетоном, пересаждали из DMF ацетоном. Выход 1,2 г (79,0%). Т. пл.  $233-235^\circ \text{C}$ .  $R_f$  0,25 (Г), 0,30 (Д).

*H-Leu-Ala-Ala-Arg-Val-Ala-Lys-Gln-Leu-Pro-OH (XXII)*. К раствору 0,2 г (0,14 ммоль) соединения (XXI) в 2 мл муравьиной кислоты добавляли 2 мл 2 н.  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$  и выдерживали 30 мин при  $20^\circ \text{C}$ . Растворитель упаривали. Остаток растворяли в 20 мл смеси метанол — муравьиная кислота (1 : 1), гидрировали и очищали на ВЭЖХ аналогично соединению (XII). Выход продукта (XXII) 0,09 г.  $[\alpha]_D^{20} -77,0^\circ$  (с 1,3,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Аминокислотный анализ: Leu 2,13 (2), Ala 2,86 (3), Arg 0,89 (1), Val 1,04 (1), Lys 1,13 (1), Gln 1,16 (1), Pro 0,91 (1).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beck E., Strochmaier K., Fcil G.//Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 22. P. 7873—7885.
2. Cheung A. K., Kupper H.//Biotechnol. Gen. Eng. Rev. 1984. V. 1. P. 223—259.
3. Weddell G. N., Yansura D. G., Dowrenko D. J., Hoaltin M. E., Grubman M. J., Moore D. M., Kleid D. G.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 9. P. 2618—2622.
4. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H.//Nature. 1982. V. 298. № 5870. P. 30—33.
5. Geysen H. M., Barteling S. I., Meloen R. H.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 1. P. 178—182.
6. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H. O.//EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869—874.

7. Francis M. J., Fry C. M., Rowlands D. J.//J. gen. Virol. 1985. V. 66. P. 2347—2354.
8. Meloen H. R., Barteling J. S.//Virology. 1986. V. 149. P. 55—63.
9. Вольпина О. М., Суровой А. Ю., Ульяшин В. В., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н.//Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1363—1371.
10. Халиков Ш. Х., Шахматов А. Н.//Иммунология. 1989. № 4. С. 18—22.
11. Халиков Ш. Х. Синтез и структурно-функциональное исследование пептидов и полипептидов регулярного строения: Дис. ... д-ра хим. наук. М.: МИТХТ им. М. В. Ломоносова, 1991. С. 13—20.
12. Суровой А. Ю., Гельфанов В. М., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н.//Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1185—1192.
13. Яров А. В., Гельфанов В. М., Гречанинова Л. А., Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Луговской А. А., Дрягалин Н. Н., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н.//Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1193—1205.
14. Халиков Ш. Х., Исмаилов М. И., Шахматов А. Н., Некрасов А. В., Борисова В. Н., Эйвазова Э. Р.//Химия природ. соединений. 1990. № 4. С. 516—520.
15. Anderson E. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M.//J. Amer. Chem. Soc. 1967. № 1—2. P. 109—128.
16. Tomlinson G., Vismanatha T.//Anal. Biochem. 1974. V. 60. P. 15—24.
17. Халиков Ш. Х., Шахматов А. Н., Исмаилов М. И.//Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1488—1499.

Поступила в редакцию  
17.II.1992

После доработки  
6.VII.1993

*Sh. Kh. Khalikov, S. V. Alieva, S. G. Ashurov*

**SYNTHESIS OF NEW FRAGMENTS OF VP<sub>1</sub> PROTEIN OF THE A<sub>22</sub>  
FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS: FRAGMENTS 134—139,  
134—145, 140—145, 150—155, 150—159**

*Tajic State University, Dushanbe*

Fragments 134—145 and 150—159 of the antigenic-region of the VP<sub>1</sub> protein of the A<sub>22</sub> foot-and-mouth disease virus were synthesized by classic methods of peptide chemistry with isobutyl chloroformate as a coupling reagent. After purification by HPLC and amino acid analysis, the free peptides H-Gly-Lys-Tyr-Ser-Ala-Gly-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly-OH and H-Leu-Ala-Ala-Arg-Val-Ala-Lys-Gln-Leu-Pro-OH were conjugated with BSA by means of N,N-dicyclohexylcarbodiimide.

The conjugates were used, with complete Freund adjuvant, for immunization on guinea pigs. The antibodies formed had a virus neutralization activity.