



УДК 547.466.64'17.027:577.182.48'1

## ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ $^{15}\text{N}$ -МЕЧЕННЫХ ЗЕРВАМИЦИНОВ ПВ

© 2000 г. В. Х. Римави<sup>#</sup>, Ан. А. Огрель, Я. Раап\*, В. И. Швец

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,  
117571, Москва, просп. Вернадского, 86;

\*Лейденский университет, Нидерланды

Поступила в редакцию 26.05.2000 г. Принята к печати 13.07.2000 г.

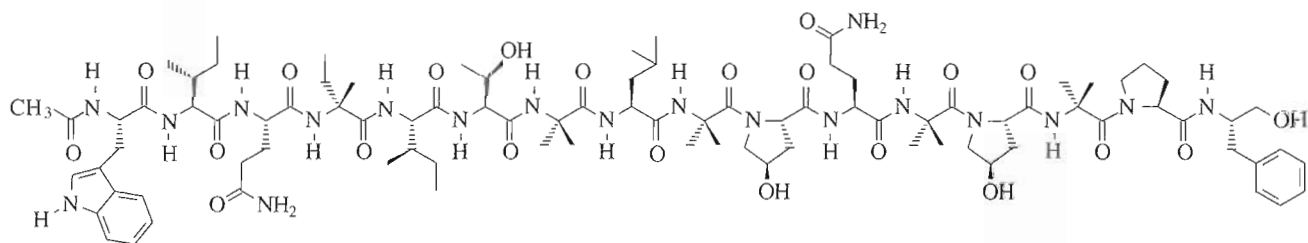
Осуществлен синтез аналогов 16-членного пептидного антибиотика зервамицина ПВ,  $\alpha$ - $^{15}\text{N}$ -меченных по остаткам Gln<sup>3</sup> или Gln<sup>11</sup>, путем конденсации фрагментов (1–4), (5–9) и (10–16). При получении фрагментов зервамицина применен метод ступенчатого наращивания пептидной цепи с C-конца в растворе с использованием гексафторфосфата бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфония (ВОР) в качестве активирующего реагента. Включение стерически затрудненной 2-аминоизомасляной кислоты осуществлялось с помощью системы ВОР/диметиламинопиридин с применением преактивации карбоксикомпонента. Фрагментная конденсация проводилась с помощью активирующего реагента гексафторфосфата б-трифторметилбензотриазол-1-илокси-трис(пирролидино)фосфония. Гомогенность синтезированных аналогов зервамицина ПВ подтверждена с помощью ВЭЖХ, а их структура доказана с помощью ЯМР-спектроскопии и ГАР-масс-спектрометрии.

Ключевые слова: пептаболы; зервамицины; изотопно-меченые пептиды; пептидный синтез;  $\alpha$ -аминоизомасляная кислота.

### ВВЕДЕНИЕ

Зервамицин ПВ представляет собой 16-членный пептидный антибиотик, выделяемый из культуры клеток *Emericellopsis salmosynnemata*,

эффективный против как грамположительных, так и граммотрицательных бактерий, но безопасный для эукариотических клеток [1]. В связи с этим он привлекает внимание исследователей в качестве потенциального лекарственного препарата.



Ac-Trp<sup>1</sup>-Ile-Gln-Iva-Ile-Thr<sup>6</sup>-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln<sup>11</sup>-Aib-Hyp-Aib-Pro-Phl<sup>16</sup>

Зервамицин ПВ

Зервамицин ПВ образует в мембранах бактерий ионные каналы, что приводит к нарушению электрохимического баланса мембран и, как

следствие этого, вызывает гибель клетки. Для конструирования новых аналогов антибиотика, обладающих лучшими фармакологическими свойствами, необходимо выяснение механизма его антибактериального действия. Однако до настоящего времени не существует модели зервамицинового канала, однозначно описывающей структурно-функциональные отношения в молекуле антибиотика [2–4]. Исключительно ценную информацию о механизме образования и функционирования ионных каналов, образуемых молекулами зервамицина, можно получить, исследуя его меченные стабильными изотопами образцы в фосфолипидных бислоях с помощью изотопно-

Сокращения: Aib – 2-аминоизомасляная кислота; Iva – изовалин; Phl – фенилаланинол; Fmoc – 9-флуоренилметилкарбонил; ВОР – бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфоний, гексафторфосфат; Нур – гидроксипролин; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DIPPA – диизопропилэтиламин; RuВОР(CF<sub>3</sub>) – б-трифторметилбензотриазол-1-илокси-трис(пирролидино)фосфоний, гексафторфосфат; RuВор – бром-трис(пирролидино)фосфоний, гексафторфосфат; НОВТ(CF<sub>3</sub>) – 1-гидрокси-б-трифторметилбензотриазол; TIPS – триизопропилсилан.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 434-83-55; факс: 434-82-33; e-mail: biotechnology@mtu-net.ru).

чувствительной техники, в частности, ЯМР-спектроскопии [5]. Изотопно-меченные пептаболы (от англ. слова *peptaibols*, где *aib* – от *Aib* и *ol* – от *alcohol*) можно получать как микробиологически [6], так и химически [7], но лишь химический путь синтеза позволяет селективно вводить метку по любому аминокислотному остатку пептидной цепи антибиотика. Так, ранее были синтезированы зервамицина ПВ, меченные  $^2\text{H}$ - [7] и  $^{15}\text{N}$ - [8] изотопами по остатку Gln в 11-м положении.

Цель нашей работы – химический синтез аналогов зервамицина ПВ, содержащих остаток [ $\alpha$ - $^{15}\text{N}$ ]Gln в 3-м или в 11-м положениях, по разработанной нами упрощенной схеме. Выбор глутамина в качестве объекта мечения основан на предположении о том, что этот остаток играет решающую роль в функционировании ионных каналов, что связано со специфической ориентацией в пространстве его боковой цепи [2].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая стратегия пептидного синтеза зервамицина была разработана в работе [7]. Она основывается на конденсации частично деблокированных фрагментов: (1–4), (5–9) и (10–16). Такой выбор фрагментов позволяет избежать риска рацемизации при конденсации, так как в качестве *S*-концевых аминокислот используются  $\alpha,\alpha$ -диалкилированные аминокислоты (Aib, Iva), в которых протон при  $\alpha$ -углероде замещен на алкильную группу. На наш взгляд, такая стратегия является оптимальной и не нуждается в усовершенствовании. Однако получение отдельных фрагментов может быть оптимизировано за счет внесения изменений в схему их синтеза. В первую очередь это относится к синтезу *S*-концевого фрагмента (10–16). В работе [9] была предложена оригинальная схема синтеза этого фрагмента, основанная на получении гексапептида (10–15) с последующей конденсацией его со свободным фенилаланинолом. То есть синтез фрагмента (10–16) начинался с *трет*-бутилового эфира пролина, получение которого является сложным процессом и проходит с весьма низким выходом, причем этот эфир используется лишь однажды на данной стадии синтеза зервамицина. Такой выбор схемы был обоснован авторами [9] тем, что связь Pro–Phe чувствительна в условиях снятия Fmoc-защитной группы (0.1 M NaOH в смеси диоксан/метанол/вода), использованной при синтезе данного фрагмента для защиты аминной функции карбоксикомпонентов.

Мы осуществили синтез *S*-концевого фрагмента зервамицина ПВ (10–16) по классической, упрощенной схеме, начиная с *S*-концевого фенилаланинола (схема). Как известно, в реакциях пептидного синтеза с участием аминокислотных компонентов со свободной гидроксильной группой существует опасность частичного *O*-ацилирования при использовании избытков карбоксикомпонентов

[10]. Для избежания протекания такой побочной реакции по остатку фенилаланинола мы применяли его 20% избыток при получении дипептида (I); а для синтеза остальных пептидов фрагмента (10–16) использовали эквимольные количества amino- и карбоксикомпонентов.

На стадии синтеза дипептида (I) реакция легко доступного Вос-Pro-OH с фенилаланинолом проходила в течение 40 мин с выходом продукта 92%. Вос-группу снимали с помощью 50% TFA в дихлорметане в течение 20 мин. При этом стадию нейтрализации остатков TFA не проводили, так как анион трифторуксусной кислоты не может быть активирован BOP-реагентом [11], а избыток TFA удаляли упариванием. Поскольку фрагмент (10–16) зервамицина ПВ содержит две кислотолабильные связи (Aib-Pro и Aib-Hyp), последующее использование Вос-аминокислот для наращивания пептидной цепи являлось неприемлемым. Поэтому в дальнейшем мы применяли Fmoc-стратегию.

При синтезе трипептида (II) и пентапептида (IV) с участием в качестве карбоксикомпонента стерически затрудненной Fmoc-Aib-OH применение стандартной методики, в которой все реагирующие вещества вводятся в реакционную массу одновременно, приводило к получению продуктов с очень низкими выходами. Поэтому для достижения приемлемых выходов мы осуществляли предактивацию Fmoc-Aib-OH с помощью системы BOP/DMAP в течение 10 мин. После этого добавляли эквимольное количество аминокислотного компонента и проводили реакцию в течение 30 мин. Немаловажным условием для достижения максимальных выходов является тщательная очистка используемых DMF и DIPEA. В целом такой подход позволил в значительной степени ограничить протекание возможных побочных реакций и получить соединения (II) и (IV) с выходами 80 и 72% соответственно.

Авторы работы [9] указывали на неустойчивость связи Pro–Phe на дальнейших стадиях в условиях удаления Fmoc-группы с помощью 0.1 M NaOH. Однако мы показали, что разрушение связи Pro–Phe можно избежать, используя для снятия Fmoc-защиты 0.04 M NaOH в смеси диоксан–метанол–вода, 30 : 9 : 1. В ходе получения фрагмента (10–16) гидроксильная группа *N*-защищенного остатка Hyp была блокирована *трет*-бутильной группировкой.

При выделении чистого продукта (VI) после применения адсорбционной колоночной хроматографии на силикагеле 60A мы использовали гель-фильтрацию на сефадексе LH-20. Соединения (III) и (VI) были получены с выходами 85 и 71% соответственно.

На стадии получения гексапептида (V) в качестве карбоксикомпонента использовался Fmoc-[ $\alpha$ - $^{15}\text{N}$ ]Gln-OH при синтезе зервамицина, меченного по Gln в 11-м, и Fmoc-Gln-OH для синтеза зервамицина, меченного по остатку Gln в 3-м положении. Снятие *трет*-бутильной защитной





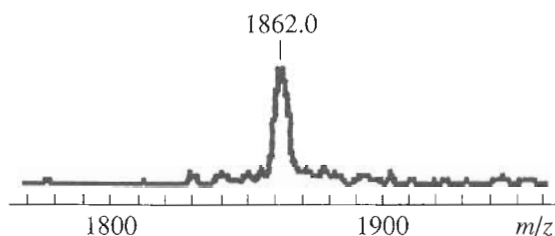


Рис. 1. Фрагмент FAB-масс-спектра  $[[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]\text{Gln}^{11}]$ зервамицина ПВ (XVI\*).

группы в остатках Нур осуществляли с помощью 50% TFA в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . При этом, по данным ТСХ, было установлено, что полное снятие кислотолабильных групп проходит в течение 20 мин при комнатной температуре без заметного разрушения связей Aib-Pro и Aib-Nур. Учитывая плохую растворимость частично деблокированного гептапептида (VI) в 0.04 М NaOH в смеси диоксанметанол-вода, 30 : 9 : 1, Fmoc-группу с N-конца удаляли с помощью 40% диэтиламина в DMF в течение 20 мин. Следует отметить, что снятие *tert*-бутильных и Fmoc-защитных групп проводили последовательно без промежуточной очистки, в результате чего полностью деблокированный гептапептид (VII) был получен с выходом 75%.

Применение классической схемы синтеза C-концевого фрагмента упростило синтез, а именно, отпала необходимость использования дорогостоящего *tert*-бутилового эфира пролина, а также дополнительной очистки на сефадексе деблокированного гексапептида (10–15) перед его конденсацией с фенилаланинолом. Более того, проведение заключительных стадий последователь-

ного удаления защитных групп (*tert*-бутильной и Fmoc-группы) без промежуточной очистки позволило уменьшить потерю конечного продукта. При этом было показано, что гидроксильная группа фенилаланинола не нуждается в дополнительной защите.

Фрагмент (1–4) синтезировали исходя из C-концевого *tert*-бутилового эфира D-Iva (схема). На стадии получения дипептида (VIII) в качестве карбоксикомпонента вводили Fmoc- $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]\text{Gln-OH}$ . Здесь следует заметить, что глутамин может вступать в побочные реакции с участием своей боковой  $\gamma$ -амидной группы. Среди них наиболее известна реакция дегидратации амидной группы с образованием нитрила [12]. Блокирование амидной функции глутамина позволяет избежать этой опасности, но введение защитных групп (например, тритильной) в боковую группу глутамина – трудоемкие процессы, проходящие с низкими выходами. Однако ранее было показано, что при конденсации аминокислот с помощью BOP-реактента амидная группа глутамина и аспарагина не подвергается дегидратации [11]. На этом основании в реакциях пептидного синтеза мы вводили Fmoc-глутамин с незащищенной боковой амидной функцией. Это позволило получить фрагмент (1–4) с высоким выходом (80%). Для синтеза зервамицина, меченного по остатку глутамина в 11-м положении, в качестве карбоксикомпонента использовался, соответственно, Fmoc-Gln-OH.

Наиболее сложным этапом в синтезе зервамицина ПВ является конденсация фрагментов. Конденсация N-ацетилизованного фрагмента (1–4) с *tert*-бутиловым эфиром пентапептида (5–9), а также N-ацетилизованного нонапептида со свободным гептапептидом с помощью DCC оказа-

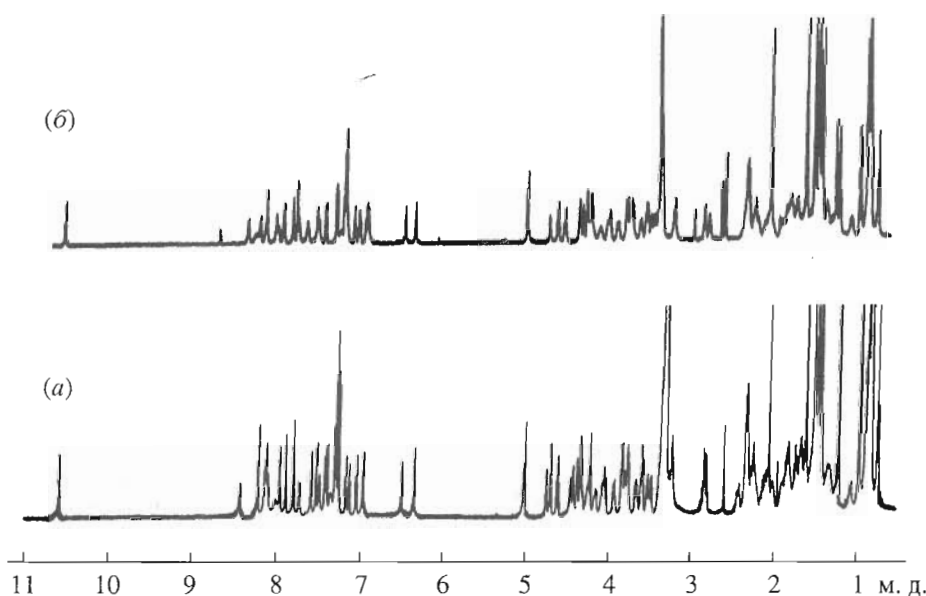
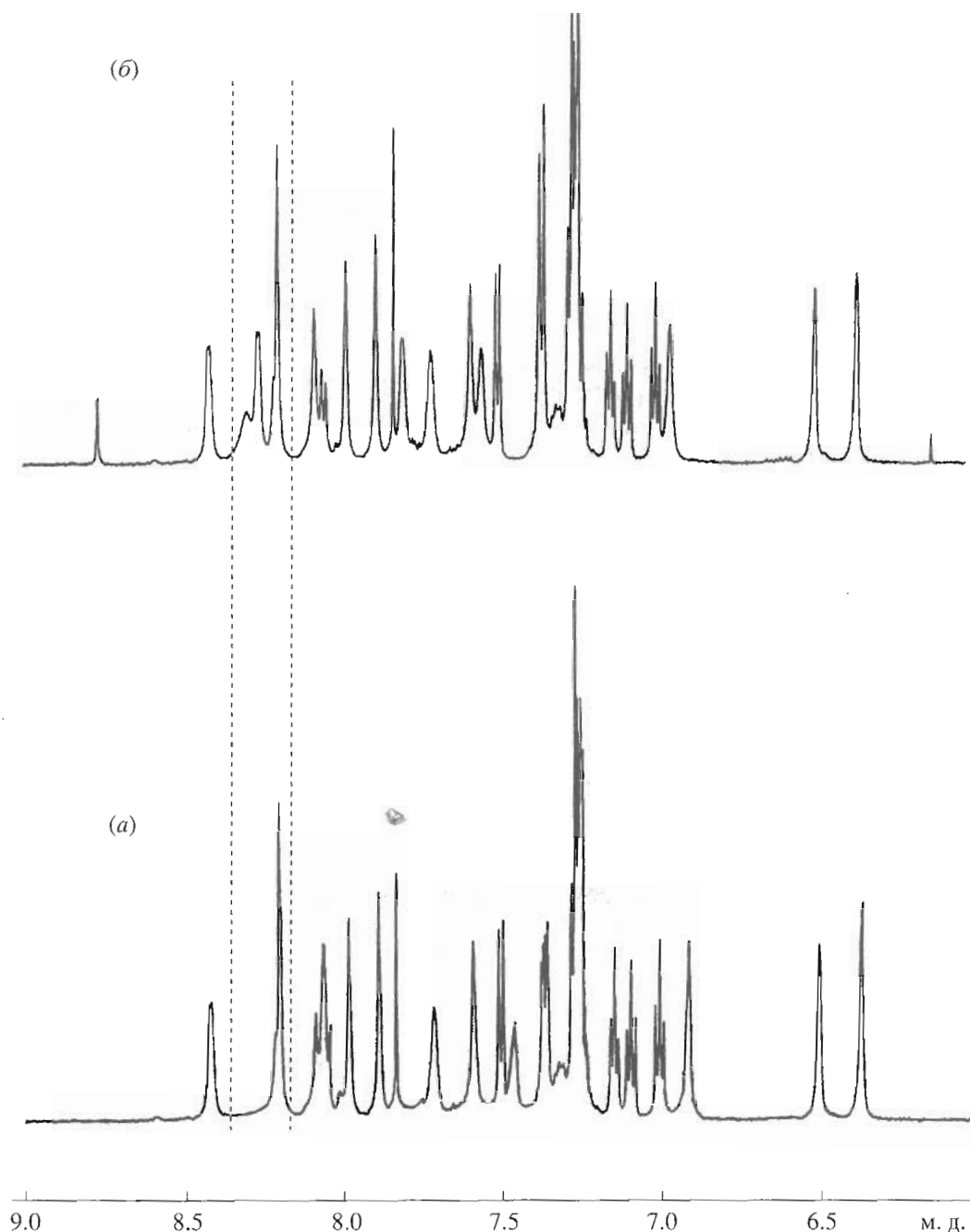


Рис. 2.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр природного (а) и  $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]\text{Gln}^{11}$ -меченого (б) зервамицинов ПВ.



**Рис. 3.** Область NH-сигналов  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра природного (а) и  $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]\text{Gln}^{11}$ -меченого (б) зервамицинов IIВ. Пунктирными линиями выделены сигналы, соответствующие  $\alpha$ -NH-протонам остатков  $\text{Gln}^{11}$  природного и  $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]\text{Gln}^{11}$ -меченого зервамицинов IIВ.

лась неудачной. С этой целью мы использовали свежеприготовленный конденсирующий реагент  $\text{PyBOR}(\text{CF}_3)$ , который, как известно, успешно используется для связывания остатков Aib со стерически затрудненными *N*-алкилированными аминокислотами в растворе [13]. Этот реагент был получен из  $\text{PyBor}$  и  $\text{NOBT}(\text{CF}_3)$  в системе растворителей дихлорметан–ацетон (1 : 1) с выходом 85% [13]. Используя этот реагент, мы получили

нонапептид (XIV) из пептидов (XII) и (XIII) с выходом 50%, а зервамицин IIВ – из нонапептида (XV) и гептапептида (VII) с выходом 30%. Реакции фрагментной конденсации проводились в DMF в присутствии DIPEA в течение 24–48 ч при pH 9–10. Выделение нонапептидов (XIV) и (XV), а также меченых зервамицинов осуществлялось с помощью ВЭЖХ.



Гомогенность синтезированных пептидов была показана с помощью ВЭЖХ. Структура промежуточных пептидов подтверждена с помощью  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии. Структура аналогов зервамицина (XVI\*) и (XVII\*) доказана данными FAB-масс-спектрометрии и  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии, наличие изотопа  $^{15}\text{N}$  – с помощью  $^{15}\text{N}$ -ЯМР-спектроскопии. Степень обогащения  $^{15}\text{N}$ -изотопом ( $98 \pm 2\%$ ) была определена с помощью FAB-масс-спектрометрии (рис. 1). На рис. 2 представлены  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры природного зервамицина ПВ (а) и синтезированного нами его аналога (XVI\*) (б). Положение  $^{15}\text{N}$ -метки можно определить при сравнении области NH-сигналов (6.0–7.5 м. д.) природного и меченого зервамицинов ПВ. Как видно из рис. 3, на месте дублета в области 8.25 м. д., соответствующей сигналу  $\alpha$ -NH-протона остатка  $\text{Gln}^{11}$  природного зервамицина (а), появляется новый сигнал этого протона (дублет дублетов) в области 8.3 м. д., что и следовало ожидать в результате дополнительного расщепления этого протона от  $^{15}\text{N}$ -изотопа.

По данным ВЭЖХ, масс-спектрометрии и  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии синтезированный по разработанной нами схеме зервамицин ПВ (XVI\*) идентичен синтезированному ранее [8].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Деблокированный фрагмент (5–9) был получен по схеме, предложенной в работе [7]. Fmoc- $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]\text{Gln-OH}$  был синтезирован по методике [14].

В настоящей работе использовались L-аминокислоты, D-Iva и их производные (Novabiochem, Швейцария), BOP-реагент (Richeleiu Biotechnologies, Канада), DMAP и DIPEA (Acros, Бельгия), очищенные безводные органические растворители (Acros, Бельгия). Контроль за протеканием реакций осуществляли с помощью ТСХ на пластинках DC-Alufolien, Kieselgel Go, F254 (Merck) в следующих системах растворителей: хлороформ–метанол, 10 : 1 (А); 8 : 1 (Б); 6 : 1 (В); изопропанол–30% аммиак, 1 : 1 (Г); хлороформ–метанол, 20 : 1 (Д); 2 : 1 (Е); 3 : 1 (Ж). Обнаружение веществ осуществляли с помощью нингидрина (0.5% раствор в ацетоне) и УФ-излучения (254 нм). Колоночную хроматографию проводили на колонке 20  $\times$  200 мм с силикагелем 60А (Acros, Бельгия); гель-хроматографию – на колонке 20  $\times$  650 мм с сефадексом LH-20 (Pharmacia); элюент – метанол. ВЭЖХ осуществляли на приборе (Knauer, Германия) с использованием колонки 10  $\times$  250 мм, Силасорб С18,  $\lambda$  детектора – 212 нм, скорость потока – 0.5 мл/мин, элюирование осуществлялось системой растворителей метанол–вода с градиентом от 1 : 1 до 99 : 1. Температуры плавления синтезированных веществ определяли на термоплавильном столике (Voetius, Германия).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры снимали в дейтерометаноле на импульсном фурье-спектрометре (Bruker WM 250, Германия) с рабочей частотой 50 МГц. Химические сдвиги в миллионных долях определены относительно внутреннего стандарта метанола ( $\delta$  49 м. д.).  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры зервамицинов регистрировали в дейтеродиметилсульфоксиде на спектрометре (Bruker DMX-600, Германия) с рабочей частотой 600 МГц относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана ( $\delta$  0.00 м. д.).  $^{15}\text{N}$ -ЯМР-спектр меченого зервамицина записывался на спектрометре (Bruker DMX-600, Германия) с рабочей частотой 60.8 МГц относительно внутреннего стандарта  $[\text{}^{15}\text{NH}_4]\text{нитрата}$  аммония (Cambridge Isotope Laboratories) ( $\delta$  19.0 м. д.).

FAB-масс-спектрометрию проводили на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ (Украина) с ионизацией осколками деления  $^{252}\text{Cf}$ . Ускоряющее напряжение  $\pm 5$  или  $\pm 20$  кВ.

**Вос-Pro-Phl (I).** К раствору 362 мг (2.4 ммоль) фенилаланинола, 430 мг (2.0 ммоль) Вос-Pro-OH и 884 мг (2.0 ммоль) BOP в 3 мл DMF добавляли 874 мкл (5 ммоль) DIPEA. Реакционную массу перемешивали 40 мин, разбавляли этилацетатом, промывали 10%  $\text{NaHCO}_3$ , 5%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и насыщенным раствором  $\text{NaCl}$ , сушили  $\text{MgSO}_4$  (далее – стандартная обработка). Растворитель упаривали, продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент: хлороформ–метанол, 60 : 1). Выход 640 мг (92%). Т. пл. 153–155°C,  $R_f$  0.50 (А).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 172.0 (C=O, Pro); 154.2 (C=O, Вос); 138.8 ( $\text{C}^\alpha$ , Phl); 127.1, 125.1, 121.0 (3  $\times$   $\text{CH}$ , аром. Phl); 83.1 ( $\text{C}^\alpha$ , Вос); 63.6 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ , Phl); 61.1 ( $\text{C}^\alpha$ , Pro); 53.1 ( $\text{C}^\alpha$ , Phl); 48.2 ( $\text{C}^\delta$ , Pro); 36.4 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ , Phl); 28.1 ( $\text{CH}_3$ , Вос); 27.4 ( $\text{C}^\beta$ , Pro); 25.7 ( $\text{C}^\gamma$ , Pro).

**Fmoc-Aib-Pro-Phl (II).** Раствор 348 мг (1.0 ммоль) дипептида (I) в 7 мл 50% TFA в хлороформе перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Растворитель упаривали. К раствору 326 мг (1.0 ммоль) Fmoc-Aib-OH в 3 мл DMF добавляли 442 мг (1.0 ммоль) BOP, 12 мг (0.1 ммоль) DMAP и перемешивали в течение 10 мин. Полученный раствор приливали к деблокированному дипептиду (I) и добавляли 600 мкл (3.5 ммоль) DIPEA. Реакционную массу перемешивали 30 мин. После стандартной обработки растворитель упаривали и продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент: хлороформ–метанол, 40 : 1). Выход 444 мг (80%). Т. пл. 110–112°C,  $R_f$  0.45 (А).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 171.3, 171.1 (2  $\times$  C=O, Aib, Pro); 155.2 (C=O, Fmoc); 143.3, 140.9 (2  $\times$   $\text{C}^\alpha$ , Fmoc); 138.8 ( $\text{C}^\alpha$ , Phl); 128.4, 127.1, 125.4, 124.5, 123.5, 122.0, 119.9 (7  $\times$   $\text{CH}$ , аром. Fmoc, Phl); 66.3 ( $\text{CH}_2$ , Fmoc); 63.6 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ , Phl); 61.3 ( $\text{C}^\alpha$ , Pro); 56.2 ( $\text{C}^\alpha$ , Aib); 53.1 ( $\text{C}^\alpha$ , Phl); 47.2 ( $\text{C}^\delta$ , Pro); 46.6 ( $\text{CH}$ , Fmoc); 36.4 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ , Phl); 27.1 ( $\text{C}^\beta$ , Pro); 25.3 ( $\text{C}^\gamma$ , Pro); 24.1, 23.5 (2  $\times$   $\text{C}^\beta$ , Aib)

**Фmoc-Нур(Bu<sup>t</sup>)-Aib-Pro-Phl (III).** Трипептид (II) (300 мг, 0.54 ммоль) обрабатывали 6.5 мл 0.04 М NaOH в смеси диоксан-метанол-вода (30 : 9 : 1) в течение 4 мин. Реакционную массу нейтрализовывали 1 н. HCl и растворитель упаривали при 0.05 мм рт. ст. Полученную массу растворяли в 3 мл DMF и добавляли 217 мг (0.54 ммоль) Фmoc-Нур(Bu<sup>t</sup>)-ОН, 238 мг (0.54 ммоль) BOP, 278 мкл (1.6 ммоль) DIPEA и перемешивали 40 мин. После стандартной обработки растворитель упаривали и продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент: хлороформ-метанол, 30 : 1). Выход 330 мг (85%). Т. пл. 120–122°C, *R<sub>f</sub>* 0.48 (B). <sup>13</sup>C-ЯМР: 173.3, 171.7, 171.3 (3 × C=O, Нур, Aib, Pro); 155.4 (C=O, Fmoc); 143.8, 141.5 (2 × C<sup>α</sup>, Fmoc); 138.8 (C<sup>α</sup>, Phl); 128.4, 127.1, 125.4, 124.5, 123.5, 122.0, 119.9 (7 × CH, аром. Fmoc, Phl); 74.2 (C<sup>α</sup>, Bu<sup>t</sup>); 70.3 (C<sup>γ</sup>, Нур); 67.9 (CH<sub>2</sub>, Fmoc); 63.6 (CH<sub>2</sub>OH, Phl); 61.9 (C<sup>α</sup>, Pro); 59.9 (C<sup>α</sup>, Нур); 56.2 (C<sup>α</sup>, Aib); 54.2 (C<sup>δ</sup>, Нур); 53.1 (C<sup>α</sup>, Phl); 47.8 (C<sup>δ</sup>, Pro); 47.5 (CH, Fmoc); 36.8 (C<sup>β</sup>, Нур); 36.4 (CH<sub>2</sub>Ph, Phl); 26.5 (C<sup>β</sup>, Pro); 28.2 (CH<sub>3</sub>, Bu<sup>t</sup>); 25.1 (C<sup>γ</sup>, Pro); 24.4, 24.1 (2 × C<sup>β</sup>, Aib).

**Фmoc-Aib-Нур(Bu<sup>t</sup>)-Aib-Pro-Phl (IV).** Пентапептид (IV) получали аналогично соединению (III) из 150 мг (0.21 ммоль) тетрапептида (III) и 68 мг (0.21 ммоль) Фmoc-Aib-ОН с использованием 89 мг (0.21 ммоль) BOP, 2.5 мг (0.021 ммоль) DMAP и 110 мкл (0.63 ммоль) DIPEA. Продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент: хлороформ-метанол, 30 : 1). Выход 120 мг (72%). Т. пл. 129–131°C, *R<sub>f</sub>* 0.44 (B). <sup>13</sup>C-ЯМР: 176.3, 174.1, 173.4, 173.1 (4 × C=O, 2 × Aib, Нур, Pro); 157.1 (C=O, Fmoc); 144.6, 142.2 (2 × C<sup>α</sup>, Fmoc); 138.8 (C<sup>α</sup>, Phl); 128.4, 127.1, 125.4, 124.5, 123.5, 122.0, 119.9 (7 × CH, аром. Fmoc, Phl); 74.9 (C<sup>α</sup>, Bu<sup>t</sup>); 70.9 (C<sup>γ</sup>, Нур); 68.4 (CH<sub>2</sub>, Fmoc); 62.5 (C<sup>α</sup>, Pro); 63.6 (CH<sub>2</sub>OH, Phl); 61.6 (C<sup>α</sup>, Нур); 57.3, 57.2 (2 × C<sup>α</sup>, Aib); 56.9 (C<sup>δ</sup>, Нур); 53.1 (C<sup>α</sup>, Phl); 47.9 (C<sup>δ</sup>, Pro); 47.1 (CH, Fmoc); 39.1 (C<sup>β</sup>, Нур); 36.4 (CH<sub>2</sub>Ph, Phl); 28.1 (CH<sub>3</sub>, Bu<sup>t</sup>); 27.3 (C<sup>β</sup>, Pro); 26.2 (C<sup>γ</sup>, Pro); 25.8, 25.1, 24.5, 24.3 (4 × C<sup>β</sup>, Aib).

**Фmoc-Gln-Aib-Нур(OBu<sup>t</sup>)-Aib-Pro-Phl (V)** получали аналогично соединению (III) из 100 мг (0.12 ммоль) пентапептида (IV) и 45 мг (0.12 ммоль) Фmoc-Gln-ОН с использованием 54 мг (0.12 ммоль) BOP и 77 мкл (0.42 ммоль) DIPEA. Продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент: хлороформ-метанол, 20 : 1). Выход 83 мг (74%). Т. пл. 134–136°C, *R<sub>f</sub>* 0.51 (B). <sup>13</sup>C-ЯМР: 176.3, 174.3, 174.1, 173.4, 173.3, 173.1 (6 × C=O, 2 × Gln, 2 × Aib, 2 × Нур, Pro); 157.1 (C=O, Fmoc); 144.6, 142.2 (2 × C<sup>α</sup>, Fmoc); 138.8 (C<sup>α</sup>, Phl); 128.4, 127.1, 125.4, 124.5, 123.5, 122.0, 119.9 (7 × CH, аром. Fmoc, Phl); 74.9 (C<sup>α</sup>, Bu<sup>t</sup>); 70.9 (C<sup>γ</sup>, Нур); 68.4 (CH<sub>2</sub>, Fmoc); 62.5 (C<sup>α</sup>, Pro); 63.6 (CH<sub>2</sub>OH, Phl); 61.6 (C<sup>α</sup>, Нур); 57.3, 57.2 (2 × C<sup>α</sup>, Aib); 56.9 (C<sup>δ</sup>, Нур); 53.9 (C<sup>α</sup>, Gln); 53.1 (C<sup>α</sup>, Phl); 47.9 (C<sup>δ</sup>, Pro); 47.1 (CH, Fmoc); 39.1 (C<sup>β</sup>, Нур); 36.4 (CH<sub>2</sub>Ph, Phl); 32.0 (C<sup>γ</sup>, Gln); 28.8 (C<sup>β</sup>, Gln); 26.2 (C<sup>γ</sup>, Pro); 25.8, 25.1, 24.5, 24.3 (4 × C<sup>β</sup>, Aib).

Gln); 28.1 (CH<sub>3</sub>, Bu<sup>t</sup>); 27.3 (C<sup>β</sup>, Pro); 26.2 (C<sup>γ</sup>, Pro); 25.8, 25.1, 24.5, 24.3 (4 × C<sup>β</sup>, Aib).

Аналогично с использованием Фmoc-[α-<sup>15</sup>N]Gln-ОН был получен <sup>15</sup>N-меченый гексапептид (V\*).

**Фmoc-Нур(Bu<sup>t</sup>)-Gln-Aib-Нур(Bu<sup>t</sup>)-Aib-Pro-Phl (VI)** получали аналогично соединению (III) из 60 мг (0.06 ммоль) гексапептида (V) и 24 мг (0.06 ммоль) Фmoc-Нур(Bu<sup>t</sup>)-ОН с использованием 27 мг (0.06 ммоль) BOP и 31 мкл (0.18 ммоль) DIPEA. Продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент: хлороформ-метанол, 20 : 1), затем на колонке с сефадексом LH-20. Выход 41 мг (71%). Т. пл. 140–142°C, *R<sub>f</sub>* 0.42 (B). <sup>13</sup>C-ЯМР: 177.3, 174.3, 174.1, 173.4, 173.3, 173.1, 172.5 (7 × C=O, 2 × Gln, 2 × Aib, 2 × Нур, Pro); 157.1 (C=O, Fmoc); 144.6, 142.2 (2 × C<sup>α</sup>, Fmoc); 138.8 (C<sup>α</sup>, Phl); 128.4, 127.1, 125.4, 124.5, 123.5, 122.0, 119.9 (7 × CH, аром. Fmoc, Phl); 74.9, 74.8 (2 × C<sup>α</sup>, Bu<sup>t</sup>); 70.9, 70.3 (2 × C<sup>γ</sup>, Нур); 68.4 (CH<sub>2</sub>, Fmoc); 62.5 (C<sup>α</sup>, Pro); 63.6 (CH<sub>2</sub>OH, Phl); 61.6, 61.2 (2 × C<sup>α</sup>, Нур); 57.3, 57.2 (2 × C<sup>α</sup>, Aib); 56.9, 55.3 (2 × C<sup>δ</sup>, Нур); 53.9 (C<sup>α</sup>, Gln); 53.1 (C<sup>α</sup>, Phl); 47.9 (C<sup>δ</sup>, Pro); 47.1 (CH, Fmoc); 39.1, 37.4 (2 × C<sup>β</sup>, Нур); 36.4 (CH<sub>2</sub>Ph, Phl); 32.0 (C<sup>γ</sup>, Gln); 28.8 (C<sup>β</sup>, Gln); 28.1, 27.8 (2 × CH<sub>3</sub>, Bu<sup>t</sup>); 27.3 (C<sup>β</sup>, Pro); 26.2 (C<sup>γ</sup>, Pro); 25.8, 25.1, 24.5, 24.3 (4 × C<sup>β</sup>, Aib).

Аналогично, исходя из гексапептида (V\*) был получен <sup>15</sup>N-меченый гептапептид (VI\*).

**Н-Нур-Gln-Aib-Нур-Aib-Pro-Phl (VII).** Гептапептид (VII) (30 мг, 0.029 ммоль) обрабатывали 3 мл 50% TFA в дихлорметане в течение 20 мин, после чего растворитель упаривали при 0.05 мм рт. ст. К полученной массе приливали 4 мл 40% диэтиламина в DMF и перемешивали в течение 30 мин, растворитель упаривали и деблокированный гептапептид (VII) выделяли с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом LH-20. Выход 18 мг (75%). Т. пл. 155–157°C, *R<sub>f</sub>* 0.74 (Г). <sup>13</sup>C-ЯМР: 177.3, 174.3, 174.1, 173.4, 173.3, 173.1, 172.5 (7 × C=O, 2 × Gln, 2 × Aib, 2 × Нур, Pro); 138.8 (C<sup>α</sup>, Phl); 127.1, 125.4, 122.0 (3 × CH, Phl); 70, 69.3 (2 × C<sup>γ</sup>, Нур); 68.4 (CH<sub>2</sub>, Fmoc); 62.5 (C<sup>α</sup>, Pro); 63.6 (CH<sub>2</sub>OH, Phl); 61.6, 58.2 (2 × C<sup>α</sup>, Нур); 57.3, 57.2 (2 × C<sup>α</sup>, Aib); 56.9, 55.3 (2 × C<sup>δ</sup>, Нур); 53.9 (C<sup>α</sup>, Gln); 53.1 (C<sup>α</sup>, Phl); 47.9 (C<sup>δ</sup>, Pro); 39.1, 37.4 (2 × C<sup>β</sup>, Нур); 36.4 (CH<sub>2</sub>Ph, Phl); 32.0 (C<sup>γ</sup>, Gln); 28.8 (C<sup>β</sup>, Gln); (C<sup>β</sup>, Pro); 26.2 (C<sup>γ</sup>, Pro); 25.8, 25.1, 24.5, 24.3 (4 × C<sup>β</sup>, Aib).

Аналогично, исходя из гептапептида (VI\*) был получен <sup>15</sup>N-меченый гептапептид (VII\*).

**Фmoc-Gln-D-Iva-OBu<sup>t</sup> (VIII)** получали аналогично соединению (I) из 35 мг (0.13 ммоль) HCl · H-D-Iva-OBu<sup>t</sup> и 55 мг (0.15 ммоль) Фmoc-Gln-ОН с использованием 64 мг (0.15 ммоль) BOP и 77 мкл (0.44 ммоль) DIPEA. Продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент: хлороформ-метанол, 30 : 1). Выход 68 мг (85%). Т. пл. 151–153°C, *R<sub>f</sub>* 0.52 (A). <sup>13</sup>C-ЯМР: 172.3, 172.0, 171.7 (3 × C=O, 2 × Gln, Iva); 156.9 (C=O, Fmoc); 144.6, 142.2 (2 × C<sup>α</sup>, Fmoc); 128.9, 127.5, 126.0, 122.1 (4 × CH,



аром. Fmoc); 80.5 (C<sup>α</sup>, Bu<sup>γ</sup>); 67.2 (CH<sub>2</sub>, Fmoc); 60.7 (C<sup>α</sup>, Iva); 53.9 (C<sup>α</sup>, Gln); 47.2 (CH, Fmoc); 34.5 (C<sup>γ</sup>, Gln); 28.6 (CH<sub>2</sub>, Iva); 28.2 (C<sup>β</sup>, Gln); 27.6 (CH<sub>3</sub>, Bu<sup>γ</sup>); 22.2 (C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>, Iva); 9.2 (C<sup>γ</sup>, Iva).

Аналогично использованием Fmoc-[α-<sup>15</sup>N]Gln-ОН был получен <sup>15</sup>N-меченый дипептид (VIII\*).

**Fmoc-Ile-Gln-D-Iva-OBu<sup>γ</sup> (IX)** получали аналогично соединению (III) из 60 мг (0.12 ммоль) дипептида (VIII) и 55 мг (0.15 ммоль) Fmoc-Ile-ОН с использованием 65 мг (0.15 ммоль) ВОР и 77 мкл (0.44 ммоль) DIPEA. Продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент: хлороформ-метанол, 30 : 1). Выход 55 мг (75%). Т. пл. 160–162°C, R<sub>f</sub> 0.41 (Д). <sup>13</sup>C-ЯМР: 172.5, 172.3, 172.0, 171.7 (4 × C=O, Ile, 2 × Gln, Iva); 156.5 (C=O, Fmoc); 144.6, 142.2 (2 × C<sup>α</sup>, Fmoc); 128.9, 127.5, 126.0, 122.1 (4 × CH, аром. Fmoc); 80.5 (C<sup>α</sup>, Bu<sup>γ</sup>); 67.2 (CH<sub>2</sub>, Fmoc); 60.7 (C<sup>α</sup>, Iva); 59.8 (C<sup>α</sup>, Ile); 53.9 (C<sup>α</sup>, Gln); 47.2 (CH, Fmoc); 36.6 (C<sup>β</sup>, Ile); 34.5 (C<sup>γ</sup>, Gln); 28.6 (CH<sub>2</sub>, Iva); 28.2 (C<sup>β</sup>, Gln); 27.6 (CH<sub>3</sub>, Bu<sup>γ</sup>); 25.3 (C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, Ile); 22.2 (C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>, Iva); 15.6, 15.4 (C<sup>γ</sup>H<sub>3</sub>, Ile); 11.5 (C<sup>δ</sup>, Ile); 9.2 (C<sup>γ</sup>, Iva).

Аналогично, исходя из дипептида (VIII\*) был получен <sup>15</sup>N-меченый трипептид (IX\*).

**Fmoc-Trp(Boc)-Ile-Gln-D-Iva-OBu<sup>γ</sup> (X)** получали аналогично соединению (III) из 50 мг (0.08 ммоль) трипептида (IX) и 65 мг (0.12 ммоль) Fmoc-Trp(Boc)-ОН с использованием 55 мг (0.12 ммоль) ВОР и 90 мкл (0.51 ммоль) DIPEA. Продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент: хлороформ-метанол, 25 : 1). Выход 57 мг (80%). Т. пл. 165–167°C, R<sub>f</sub> 0.50 (А). <sup>13</sup>C-ЯМР: 173.3, 172.9, 172.5, 172.3, 172.0 (5 × C=O, Trp, Ile, 2 × Gln, Iva); 156.5 (C=O, Fmoc); 149.1 (C=O, Boc); 144.6, 142.2 (2 × C<sup>α</sup>, Fmoc); 136.0, 134.6, 115.6 (3 × C<sup>α</sup>, Trp); 128.9, 127.5, 126.0, 122.1 (4 × CH, аром. Fmoc); 121.6–115.1 (5 × CH, аром. Trp); 83.4 (C<sup>α</sup>, Boc); 78.0 (C<sup>α</sup>, Bu<sup>γ</sup>); 67.2 (CH<sub>2</sub>, Fmoc); 61.7 (C<sup>α</sup>, Ile); 60.7 (C<sup>α</sup>, Iva); 53.9 (C<sup>α</sup>, Gln); 53.3 (C<sup>α</sup>, Trp); 47.2 (CH, Fmoc); 36.6 (C<sup>β</sup>, Ile); 34.5 (C<sup>γ</sup>, Gln); 28.6 (CH<sub>2</sub>, Iva); 28.2 (C<sup>β</sup>, Gln); 28.1 (CH<sub>3</sub>, Boc); 27.9 (CH<sub>3</sub>, Bu<sup>γ</sup>); 27.3 (C<sup>β</sup>, Trp); 25.3 (C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, Ile); 22.2 (C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>, Iva); 15.6 (C<sup>γ</sup>H<sub>3</sub>, Ile); 11.2 (C<sup>δ</sup>, Ile); 9.2 (C<sup>γ</sup>, Iva).

Аналогично, исходя из трипептида (IX\*) был получен <sup>15</sup>N-меченый тетрапептид (X\*).

**Ac-Trp(Boc)-Ile-Gln-D-Iva-OBu<sup>γ</sup> (XI)**. Тетрапептид (X) (50 мг, 0.055 ммоль) деблокировали с помощью 1.7 мл 0.04 М раствора NaOH в смеси диоксан-метанол-вода (30 : 9 : 1) в течение 4 мин. После упаривания растворителя к полученной массе добавляли 1 мл уксусного ангидрида в 5 мл дихлорметана. Значение pH довели до 9–10 добавлением DIPEA. Перемешивали 20 мин. После стандартной обработки продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент: хлороформ-метанол, 20 : 1). Выход 35 мг (89%). Т. пл. 155–157°C, R<sub>f</sub> 0.45 (А). <sup>13</sup>C-ЯМР: 173.5, 173.3, 172.9, 172.5, 172.3, 172.0 (6 × C=O, Ac, Trp, Ile, 2 × Gln,

Iva); 149.1 (C=O, Boc); 136.0, 134.6, 115.6 (3 × C<sup>α</sup>, Trp); 121.6–115.1 (5 × CH, аром. Trp); 83.4 (C<sup>α</sup>, Boc); 78.0 (C<sup>α</sup>, Bu<sup>γ</sup>); 61.7 (C<sup>α</sup>, Ile); 60.7 (C<sup>α</sup>, Iva); 53.9 (C<sup>α</sup>, Gln); 53.3 (C<sup>α</sup>, Trp); 36.6 (C<sup>β</sup>, Ile); 34.5 (C<sup>γ</sup>, Gln); 28.6 (CH<sub>2</sub>, Iva); 28.2 (C<sup>β</sup>, Gln); 27.9 (CH<sub>3</sub>, Boc); 27.6 (CH<sub>3</sub>, Bu<sup>γ</sup>); 27.3 (C<sup>β</sup>, Trp); 25.0 (C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, Ile); 22.5 (CH<sub>3</sub>, Ac); 22.2 (C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>, Iva); 15.6 (C<sup>γ</sup>H<sub>3</sub>, Ile); 11.3 (C<sup>δ</sup>, Ile); 9.4 (C<sup>γ</sup>, Iva).

Аналогично, исходя из тетрапептида (X\*) был получен <sup>15</sup>N-меченый тетрапептид (XI\*).

**Ac-Trp-Ile-Gln-(D)-Iva-ОН (XII)**. Тетрапептид (XI) (25 мг, 0.034 ммоль) обрабатывали 4 мл смеси TFA-TIPS-вода (90 : 5 : 5). Перемешивали 30 мин, растворитель упаривали при 0.05 мм рт. ст. и продукт (XII) выделяли с помощью гель-фильтрации на сефадексе LH-20. Выход 18 мг (90%). Т. пл. 162–164°C, R<sub>f</sub> 0.45 (В). <sup>13</sup>C-ЯМР: 173.5, 173.3, 172.9, 172.5, 172.3, 172.0 (6 × C=O, Ac, Trp, Ile, 2 × Gln, Iva); 136.0, 134.6, 115.6 (3 × C<sup>α</sup>, Trp); 121.6–115.1 (5 × CH, аром. Trp); 61.7 (C<sup>α</sup>, Ile); 60.7 (C<sup>α</sup>, Iva); 53.9 (C<sup>α</sup>, Gln); 53.3 (C<sup>α</sup>, Trp); 36.6 (C<sup>β</sup>, Ile); 36.1 (C<sup>β</sup>, Ile); 34.5 (C<sup>γ</sup>, Gln); 28.6 (CH<sub>2</sub>, Iva); 28.2 (C<sup>β</sup>, Gln); 27.3 (C<sup>β</sup>, Trp); 25.3 (C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, Ile); 22.5 (CH<sub>3</sub>, Ac); 22.2 (C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>, Iva); 15.6 (C<sup>γ</sup>H<sub>3</sub>, Ile); 11.5 (C<sup>δ</sup>, Ile); 9.3 (C<sup>γ</sup>, Iva).

Аналогично, исходя из тетрапептида (XI\*) был получен <sup>15</sup>N-меченый тетрапептид (XII\*).

**Ac-Trp-Ile-Gln-Iva-Ile-Thr(Bu<sup>γ</sup>)-Aib-Leu-Aib-OBu<sup>γ</sup> (XIV)**. Раствор 15 мг (0.03 ммоль) тетрапептида (XII), 20 мг (0.03 ммоль) пентапептида (XIII) [7] и 37 мг (0.062 ммоль) PyBOP(CF<sub>3</sub>) в 0.5 мл DMF (значение pH довели до 9–10 добавлением DIPEA) перемешивали 24 ч. Добавляли 2 мл воды и упаривали при 0.05 мм рт. ст. Продукт выделяли с помощью гель-фильтрации на сефадексе LH-20 и ВЭЖХ (время удерживания 29 мин). Выход: 15 мг (50%) (масло). R<sub>f</sub> 0.53 (В). <sup>13</sup>C-ЯМР: 173.6, 173.3, 172.9, 172.5, 172.3, 172.0, 171.7, 170.2, 169.9, 169.2, 168.9 (11 × C=O, Ac, Trp, 2 × Ile, 2 × Gln, Iva, Thr, Leu, 2 × Aib); 136.0, 134.6, 115.6 (3 × C<sup>α</sup>, Trp); 121.6–115.1 (5 × CH, аром. Trp); 80.5 (C<sup>α</sup>, COOBu<sup>γ</sup>); 78.0 (C<sup>α</sup>, Bu<sup>γ</sup>); 65.9 (C<sup>β</sup>, Thr); 61.7 (C<sup>α</sup>, Ile); 60.7 (C<sup>α</sup>, Iva); 59.8 (C<sup>α</sup>, Ile); 58.8 (C<sup>α</sup>, Thr); 57.5, 56.5 (2 × C<sup>α</sup>, Aib); 53.9 (C<sup>α</sup>, Gln); 53.4 (C<sup>α</sup>, Leu); 53.3 (C<sup>α</sup>, Trp); 41.5 (C<sup>β</sup>, Leu); 36.6 (C<sup>β</sup>, Ile); 36.1 (C<sup>β</sup>, Ile); 34.5 (C<sup>γ</sup>, Gln); 28.6 (CH<sub>2</sub>, Iva); 28.2 (C<sup>β</sup>, Gln); 27.6 (CH<sub>3</sub>, COOBu<sup>γ</sup>); 27.3 (C<sup>β</sup>, Trp); 27.2 (CH<sub>3</sub>, Bu<sup>γ</sup>); 27.4–21.4 (4 × C<sup>β</sup>, Aib, C<sup>γ</sup>, Leu, 2 × C<sup>δ</sup>, Leu); 25.3 (C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, Ile); 25.0 (C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, Ile); 22.2 (C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>, Iva); 17.4 (C<sup>γ</sup>, Thr); 15.6, 15.4 (2 × C<sup>γ</sup>H<sub>3</sub>, Ile); 11.5, 11.2 (2 × C<sup>δ</sup>, Ile); 9.2 (C<sup>γ</sup>, Iva).

Аналогично из <sup>15</sup>N-меченого пептида (XII\*) был получен <sup>15</sup>N-меченый нонапептид (XIV\*).

**Ac-Trp-Ile-Gln-Iva-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-ОН (XV)**. Нонапептид (XIV) (12 мг, 0.01 ммоль) деблокировали аналогично соединению (XII). Растворитель упаривали и продукт выделяли с помощью гель-фильтрации на сефадексе LH-20 и ВЭЖХ (время удерживания 21 мин). Выход 9 мг (76%). Т. пл.



140–142°C,  $R_f$  0.59 (E).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 173.6, 173.3, 172.9, 172.5, 172.3, 172.0, 171.7, 170.2, 169.9, 169.2, 168.9 (11 × C=O, Ac, Trp, 2 × Ile, 2 × Gln, Iva, Thr, Leu, 2 × Aib); 136.0, 134.6, 115.6 (3 × C<sup>q</sup>, Trp); 121.6–115.1 (5 × CH, аром. Trp); 65.9 (C<sup>β</sup>, Thr); 61.7 (C<sup>α</sup>, Ile); 60.7 (C<sup>α</sup>, Iva); 59.8 (C<sup>α</sup>, Ile); 58.8 (C<sup>α</sup>, Thr); 57.5, 56.5 (2 × C<sup>α</sup>, Aib); 53.9 (C<sup>α</sup>, Gln); 53.4 (C<sup>α</sup>, Leu); 53.3 (C<sup>α</sup>, Trp); 41.5 (C<sup>β</sup>, Leu); 36.7 (C<sup>β</sup>, Ile); 36.2 (C<sup>β</sup>, Ile); 34.5 (C<sup>γ</sup>, Gln); 28.6 (CH<sub>2</sub>, Iva); 28.2 (C<sup>β</sup>, Gln); 27.3 (C<sup>β</sup>, Trp); 27.4–21.4 (4 × C<sup>β</sup>, Aib, C<sup>γ</sup>, Leu, 2 × C<sup>δ</sup>, Leu); 25.3 (C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, Ile); 25.0 (C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>, Ile); 22.2 (C<sup>β</sup>H<sub>3</sub>, Iva); 17.4 (C<sup>γ</sup>, Thr); 15.6, 15.4 (2 × C<sup>γ</sup>H<sub>3</sub>, Ile); 11.5, 11.2 (2 × C<sup>δ</sup>, Ile); 9.0 (C<sup>γ</sup>, Iva).

Аналогично из пептида (XIV\*) был получен  $^{15}\text{N}$ -меченый нонапептид (XV\*).

[[ $\alpha$ - $^{15}\text{N}$ ]Gln<sup>11</sup>]Зервамицин IIВ (XVI\*). К раствору 8 мг (0.008 ммоль) нонапептида (XV) в 1 мл DMF добавляли 9 мг (0.011 ммоль) гептапептида (VII\*) и 10 мг (0.016 ммоль) РубОР(СF<sub>3</sub>). Значение рН доводили до 9–10 добавлением DIPEA. Перемешивали 48 ч. Добавляли 5 мл воды и упаривали. Продукт выделяли с помощью ВЭЖХ (время удерживания 31 мин). Выход 5 мг (30%). Т. пл. 199–201°C,  $R_f$  0.52 (Ж).  $^{15}\text{N}$ -ЯМР (ацетон- $d_6$ ): 109.935. FAB-MS ( $m/z$ ): 1862.0 ( $M + \text{Na}$ )<sup>+</sup>, вычислено 1862.0.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр полученного зервамицина представлен на рис. 2.

Аналогично из меченого пептида (XV\*) и немеченого (VII) был получен [[ $\alpha$ - $^{15}\text{N}$ ]Gln<sup>3</sup>]зервамицин IIВ (XVII\*).

Данная работа проводилась при финансовой поддержке Нидерландской организации научных исследований (NWO), проект № 047.006.009. Авторы выражают благодарность Алексею Огрелю за консультацию, С. Эркеленс за снятие

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектра (600 МГц) и А. Аидинову за снятие FAB-масс-спектра.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Argoudelis A.D., Dietz A., Jhonson L.E. // J. Antibiotics. 1974. V. 27. P. 321–327.
2. Isabella L., Karle I., Judith L., Flippen-Anderson J., Agarwalla S., Balaram P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 5307–5311.
3. Sanson M.S.P., Balaram P., Karle I. // Eur. Biophys. J. 1993. V. 21. P. 369–383.
4. Karle I., Agarwalla S., Balaram P. // Biopolymers. 1994. V. 34. P. 721–735.
5. Killian J., Taylor M., Koeppel R. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 11283–11289.
6. Egorova-Zachernyuk T. A., Shvets V. I., Lugtenburg J., Raap J. // J. Pep. Sci. 1996. V. 2. P. 1–10.
7. Ogral A., Bloemhoff W., Lugtenburg J., Raap J. // J. Pep. Sci. 1997. V. 3. P. 193–208.
8. Ogral An., Ogral A., Ogral S., Shvets V., Raap J. // Letters in Peptide Science. 1998. V. 5. P. 175–178.
9. Ogral A., Bloemhoff W., Lugtenburg J., Raap J. // Liebigs Ann. Chem. 1997. V. 12. P. 41–47.
10. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. М.: Мир, 1985.
11. Castro B., Dormoy J., Evin G., Selve C. // Tetrahedron Lett. 1975. V. 16. P. 1219.
12. Fields G., Noble R. // Int. J. Pep. Prot. Res. 1990. V. 35. P. 161–167.
13. Wijkmans J., Kruijtzter J., van der Marel G., van Boom J., Bloemhoff W. // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1994. V. 113. P. 394–397.
14. Paul B., Kortenaar T., Benno G., Petters J., Bert J., Adams P., Tesser G. // Int. J. Pep. Prot. Res. 1986. V. 27. P. 398–400.

## Chemical Synthesis of $^{15}\text{N}$ -Labeled Analogues of Zervamicin IIВ

W. H. Rimawi\*<sup>#</sup>, An. A. Ogral\*, J. Raap\*\*\*, and V. I. Shvets\*

\*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

\*\*Leiden University, The Netherlands

Analogues of 16-membered peptide antibiotic zervamicin IIВ with the Gln<sup>3</sup> and Gln<sup>11</sup> residues  $^{15}\text{N}$ -labeled at the C<sup>α</sup>-atoms were synthesized by coupling the antibiotic segments (1–4), (5–9), and (10–16). In turn, these were prepared by a stepwise chain elongation in solution starting from their C-termini using benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) as an activating agent. The sterically hindered 2-aminoisobutyric acid was introduced by the BOP–dimethylaminopyridine system with the preactivation of the carboxyl component. The segment condensation was performed with the use of the 6-trifluoromethylbenzotriazol-1-yloxy-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate activating reagent. The homogeneity of the resulting zervamicin analogues was confirmed by HPLC, and their structures were proved by NMR spectroscopy and FAB mass spectrometry.

*Key words:*  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, isotope-labeled peptides, peptaibols, peptide synthesis, zervamicins

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 434-8355; fax: +7 (095) 434-8233; e-mail: biotechnology@mtu-net.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 11. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.