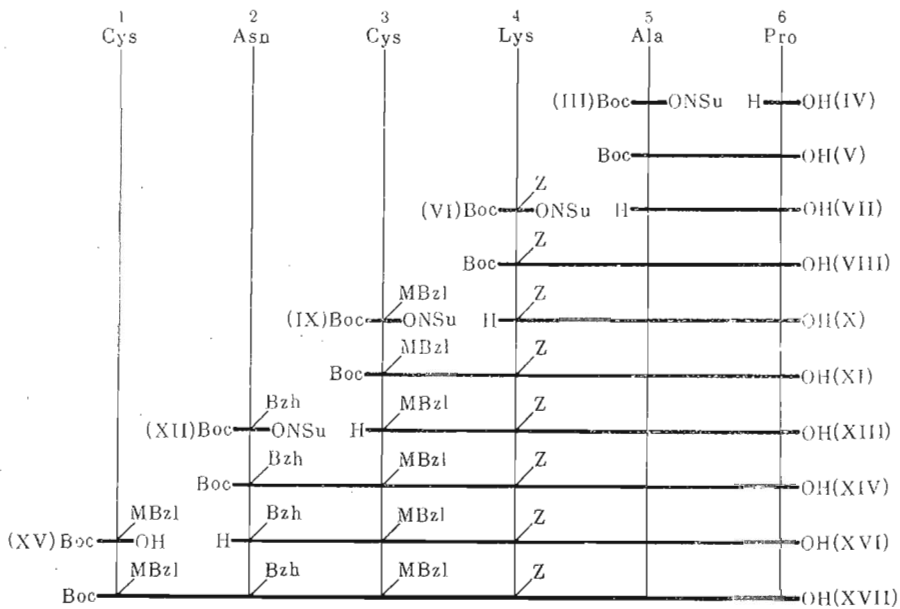


Схема 1



Защищенный 18-членный пептид (II), отвечающий аминокислотной последовательности апамина, получен сочетанием классического и твердофазного методов синтеза (см. схемы 1—3).

Для α -аминогрупп использовалась *tert*-бутилоксикарбонильная защита (Boc)*, а ϵ -аминогруппа лизина была защищена бензилоксикарбонильным остатком. Сульфгидрильная функция цистеина защищалась метоксibenзильной группой, амидная функция аспарагина и глутамина — бензгидрильным остатком, а гуанидиногруппа аргинина — тозилльной группой. Для блокирования имидазола гистидина вводили удаляемую аммонолизом динитрофенильную группу, γ -карбоксильную группу глутаминовой кислоты превращали в бензиловый эфир.

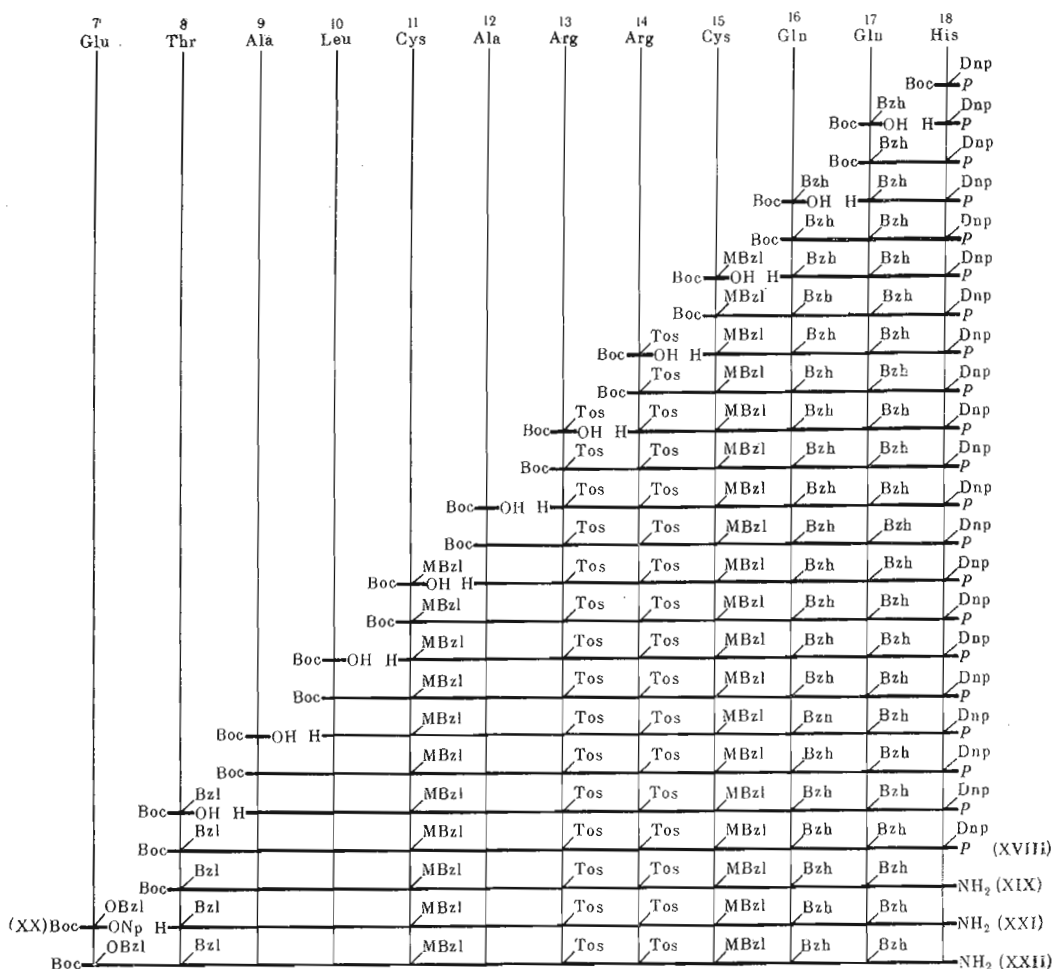
Снятие *tert*-бутилоксикарбонильной защиты при синтезе N-концевого пептида 1—6 (XVII) (схема 1) производили эфиратом трехфтористого бора, менее агрессивным по отношению к N ϵ -лизиновой бензилоксикарбонильной группе, чем обычно используемая трифторуксусная кислота [2], а при синтезе C-концевого ундекапептида 8—18 (XVIII) (схема 2) — 30%ным раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле.

N-Концевой гексапептид 1—6 (XVII) (схема 1) синтезирован классическим методом, начиная с пролина, последовательным наращиванием пептидной цепи методом активированных эфиров и очищен с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Присутствие в нем C-концевого пролина позволяло избежать опасности рацемизации при последующей блочной конденсации.

C-Концевой ундекапептид 8—18 (XVIII) синтезирован твердофазным методом (схема 2) с использованием хлорметилированного сополимера стирола и дивинилбензола [3—5]. Синтез проводили карбодиимидным методом на автоматическом синтезаторе пептидов фирмы Beckman, начиная с гистидина, присоединенного к полимеру, последовательным наращиванием пептидной цепи по заданной программе (см. «Экспериментальную часть»).

* В работе приняты стандартные сокращения, рекомендованные Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC — IUB; кроме того, использованы следующие сокращения: MBzl — *p*-метоксibenзил, Bzh — бензгидрил, Dnp — динитрофенил, DCC — диметилгексилкарбодимид, НОВТ — 1-оксibenзотриазол.

Схема 2



Физико-химические характеристики и аминокислотный состав синтетического апамина и промежуточных продуктов

| Соединение | $[\alpha]_D^{20}$, град (с, растворитель) | R_f в системе | | | Данные аминокислотного анализа | | | | | | | | | | | |
|-------------------|---|-----------------|------|------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | А | Б | Г | Asp | Thr | Gln | Glu | Pro | Ala | Cys * | Leu | His | Lys | Arg | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (V) | -94(1,1, MeOH) | 0,58 | 0,63 | | - | - | - | - | 1,0 | 1,0 | - | - | - | - | - | - |
| (VIII) | -41(1,0, MeOH) | 0,50 | 0,57 | | - | - | - | - | 1,0 | 1,0 | - | - | - | - | 1,1 | - |
| (XI) | -58(1,1, ДМФА) | 0,46 | 0,53 | | - | - | - | - | 1,1 | 1,0 | 0,5 | - | - | - | 1,0 | - |
| (XIV) | -46(2,0, ДМФА) | 0,40 | 0,45 | | 1,0 | - | - | - | 1,1 | 1,0 | 0,4 | - | - | - | 1,0 | - |
| (XVII) | -31(1,2, ДМФА) | 0,34 | 0,38 | | 1,0 | - | - | - | 1,1 | 1,0 | 1,0 | - | - | - | 1,0 | - |
| (XIX) | -25(1,3, ДМФА) | 0,15 | 0,20 | | - | 1,0 | 2,0 | - | - | 1,9 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | 0,9 | - | 2,2 |
| (XXII) | -23(1,3, ДМФА) | 0,07 | 0,12 | | - | 0,9 | 3,1 | - | - | 2,0 | 0,9 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | - | 2,2 |
| (II) | -16(1,4, ДМФА) | | | | 4,0 | 0,9 | 2,7 | 1,1 | 1,1 | 3,0 | 1,5 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 1,0 | 2,0 |
| (I) | | | | 0,35 | 4,0 | 1,0 | 3,0 | 0,9 | 0,9 | 3,0 | 2,0 | 0,9 | 0,9 | 1,0 | 1,0 | 1,9 |
| Апамин (теор.) | | | | | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |

* Данные для цистеина занижены из-за его окисления в стандартных условиях гидролиза; специально анализ для определения цистеина не проводился.

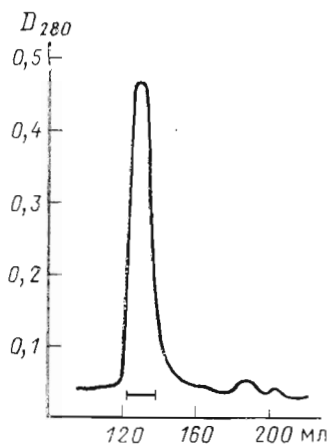


Рис. 1

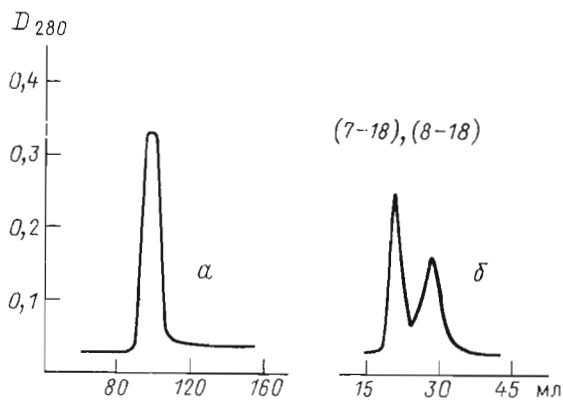


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография ундекапептида 8—18 (XIX) на колонке ($2,5 \times 100$ см) с сефадексом LH-20 в диметилформамиде. Указанная фракция подвергнута рехроматографии в тех же условиях

Рис. 2. Хроматография додекапептида 7—18 (XXII) (а) и его модельной смеси с ундекапептидом 8—18 (XIX) (б) на сефадексе LH-20 в диметилформамиде. Колонки $2,5 \times 100$ см (а) и 1×25 см (б)

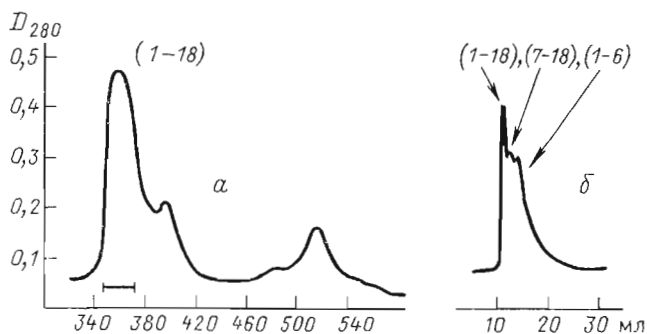


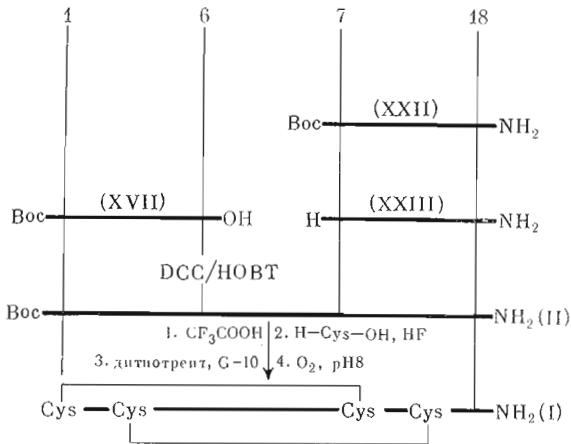
Рис. 3. Выделение октадекапептида 1—18 (II) хроматографией на колонке (3×150 см) с сефадексом LH-20 в диметилформамиде (а). Указанная фракция подвергнута рехроматографии в тех же условиях. Хроматография модельной смеси октадекапептида 1—18 (II) и фрагментов 7—18 (XXI), 1—6 (XVII) на колонке (1×25 см) в диметилформамиде (б)

ные фрагменты и защищенный октадекапептид 1—18 (II), который подвергался очистке путем хроматографии (рис. 3а) и рехроматографии на сефадексе LH-20.

Хроматография модельной смеси (1—18) + (7—18) + (1—6) показала (рис. 3 б), что октадекапептид (II) отличается по хроматографической подвижности от обоих фрагментов, использованных для конденсации. Данные аминокислотного анализа защищенного пептида 1—18 (II) согласуются с аминокислотным составом апамина (см. таблицу).

Следовало ожидать значительных трудностей на стадии удаления защитных групп в октадекапептиде (II) и при последующем замыкании дисульфидных связей. В ряде работ [6—9] сообщается о побочных реакциях, вызываемых жидким HF, широко используемым как при отщеплении пептидов от полимеров после завершения твердофазного синтеза, так и для деблокирования пептидов, полученных классическими методами. При удалении защитных групп цистеинсодержащих пептидов допол-

Схема 3



нительные осложнения могут быть связаны с высокой реакционной способностью сульфгидрильных групп [10], которые становятся свободными при действии HF. Так, в отличие от белков с интактными дисульфидными связями [11] обработка жидким HF соответствующих восстановленных форм сопровождалась образованием значительных количеств полимеров [12, 13], тогда как последующее окисление или не удавалось, или приводило к низким выходам желаемого (биологически активного) продукта.

На основании данных, изложенных в предыдущем сообщении [1], для подавления побочных реакций, протекание которых связано с наличием свободных SH-групп, удаление защитных групп в октадекапептиде (II) (после предварительного удаления α -Boc-группы действием трифторуксусной кислоты) проводили действием HF в присутствии анизол и цистеина. Обработку реакционной смеси, а также все последующие стадии (повторное восстановление, обессоливание, реокисление и хроматографию) осуществляли в условиях, описанных в предыдущей работе [1].

При последовательной хроматографии на CM-целлюлозе CM-32 (рис. 4) и биорексе 70 (рис. 5) выделены фракции, аналогичные тем, что получаются при подобных обработках восстановленного природного апамина (ср. рис. 5 [1]).

Синтетический продукт, очищенный на CM-32 (выход 18% в расчете на защищенный пептид), имеет аминокислотный состав, соответствующий природному апамину (однако содержание пептидного материала занижено), ту же подвижность при ТСХ и обладает активностью, свойственной апамину, однако значения эллиптичности для него в 2—3 раза ниже, чем для природного нейротоксина (рис. 6).

Продукт, полученный после дальнейшей очистки этого материала на биорексе 70 (фракция В, рис. 5), имеет аминокислотный состав (при нормальном содержании пептидного материала) и хроматографическую подвижность природного апамина и, что наиболее существенно, идентичен ему по данным КД (рис. 6) и токсичности (характерные симптомы апамина и гибель животных при дозах 2—4 мг/кг).

Выход синтетического апамина (фракция В, рис. 5) составил лишь ~1% в расчете на защищенный октадекапептид 1—18 (II), или 5% от «апаминовой фракции», выделенной при хроматографии на CM-32. Поскольку эти цифры значительно ниже выходов на соответствующих стадиях для природного апамина (см. схему 4), можно сделать вывод о протекании в ходе синтеза или при удалении защитных групп действием жидкого HF значительного числа неизвестных побочных процессов.

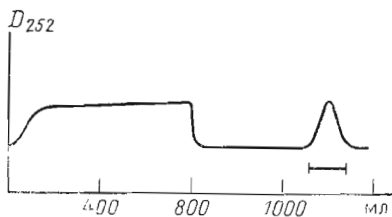


Рис. 4

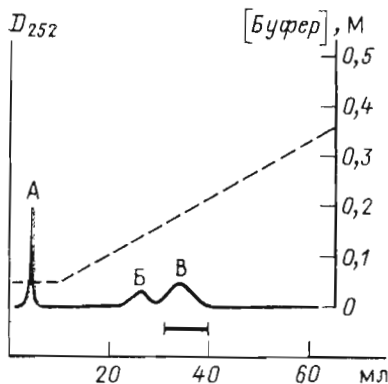


Рис. 5

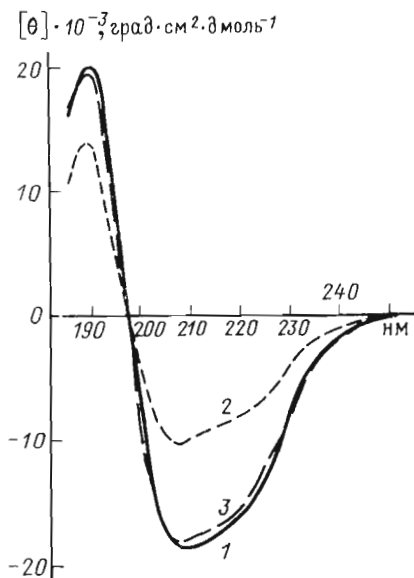


Рис. 6

Рис. 4. Хроматография продукта, полученного после деблокирования октадекапептида 1—18 (II) и окисления на колонке с СМ-целлюлозой СМ-32 (1×10 см). 0—800 мл — нанесение раствора, в котором проводилось реокисление (после подкисления до рН 5,1), промывка 0,1 М аммоний-ацетатным буфером, рН 5,1 (30 мл), градиент аммоний-ацетатного буфера 0,1 М, рН 5,1 (200 мл) — 0,2 М, рН 6,5 (100 мл), далее 0,2 М аммоний-ацетатный буфер, рН 6,5 (60 мл). Отмечена фракция, проявляющая активность апамина

Рис. 5. Хроматография апаминовой фракции (рис. 4) на колонке ($1 \times 1,5$ см) с биорексом 70 в градиенте аммоний-ацетатного буфера (рН 7,5) 0,05—0,5 М (по 40 мл). Отмечена фракция, идентичная апамину

Рис. 6. Кривые КД (в воде) нативного апамина (1) и синтетического апамина после очистки на СМ-целлюлозе СМ-32 (2) и биорексе 70 (3). Приведены значения $[\theta]$ в расчете на один остаток

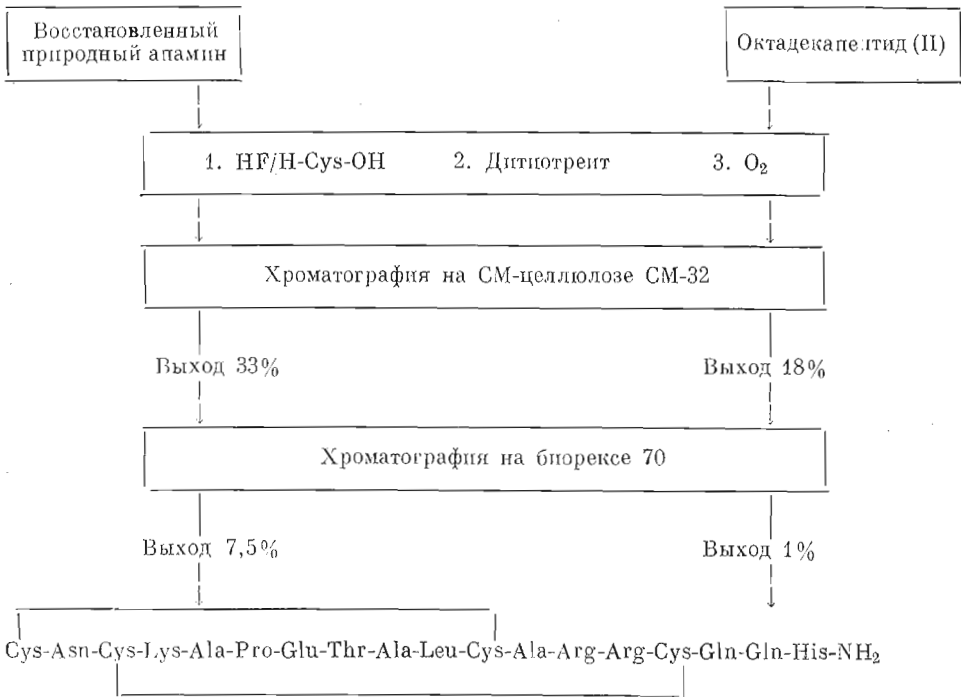
Полученные нами данные интересно сопоставить с данными по синтезу апамина и его аналогов [14—16], которые были опубликованы во время выполнения настоящей работы.

В работе [14] описан полный синтез апамина, осуществленный твердофазным методом. Авторы проводили одновременное удаление защитных групп и отщепление пептида от полимера действием жидкого HF. Хотя при этом не применялись тиолзащитные реагенты, удалось получить продукт, который по всем использованным авторами тестам был идентичен природному апамину. Выход синтетического пептида после ионообменной хроматографии на СМ-52 (и обессоливания на биогеле Р-4) составил ~15% в расчете на сырой продукт, полученный после обработки пептидилполимера жидким HF, что близко к нашим результатам.

В кратком сообщении [16] помимо утверждения о биологической активности синтетического образца апамина не приводятся какие-либо количественные данные или экспериментальные подробности.

Недавно был опубликован твердофазный синтез трех аналогов апамина, в том числе и $[\text{Na}^4]$ апамина (выход 14% в расчете на пептидилполимер), идентичного по токсичности природному апамину [15]. В этом син-

Схема 4



тезе применялся набор защитных групп, отличающийся от использованного нами или в работе [14], однако также проводилась обработка жидким HF для удаления защитных групп и отщепления от полимера, а основной стадией очистки была хроматография на СМ-целлюлозе (СМ-52). Кривые КД полученных в работах [14, 15] препаратов не снимались.

На основании данной и предыдущей работ можно предположить, что критерии идентичности природному продукту, использованные авторами работ [14, 15], недостаточны и что полученные ими препараты содержат примесь, для удаления которой необходима дополнительная очистка — например, примененная нами хроматография на биорексе 70.

Экспериментальная часть

Индивидуальность всех полученных соединений контролировали ТСХ на силикагеле (Eastman, Silufol или Merck) в системах: хлороформ — этилацетат — метанол, 6 : 3 : 1 (А), хлороформ — этилацетат — метанол — уксусная кислота, 6 : 3 : 1 : 0,2 (Б), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин, 4 : 1 : 1 : 1 (В), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин, 30 : 6 : 24 : 20 (Г). При получении защищенных аминокислот и пептидов реакционную массу промывали водой, 10% раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором NaHCO₃, водой и высушивали MgSO₄ или Na₂SO₄. Все полученные продукты, кроме (VIII), являются аморфными продуктами.

Кислотный гидролиз пептидов проводили 24 ч 6 н. HCl при 110°. Для аминокислотного анализа применяли аминокислотный анализатор фирмы Durrum D-500.

Гидролиз аминокислотного полимера осуществляли в течение 24 ч после снятия Вос-защиты (на аликвоте) в смеси диоксан — HCl (1 : 1) в запаянной под вакуумом ампуле при 110°. Кривые КД получены на дихрографе

Jobin-Yvon III при 23—26° в H₂O (*c* 1,71—1,78·10⁻⁴ M). Удельное вращение измеряли при 25° на поляриметре Perkin-Elmer 141, длина кюветы 1 дм. Физико-химические характеристики и аминокислотный состав синтетического апамина и промежуточных продуктов приведены в таблице.

Снятие защитных групп в октадекапептиде жидким фтористым водородом проводили в приборе, предложенном Сакакибарой [17].

Voc-Ala-Pro-OH (V). К раствору 8,4 г (100 ммоль) NaHCO₃' и 11,5 г (100 ммоль) пролина (IV) в 100 мл воды при интенсивном перемешивании добавляли раствор 14,5 г (50 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира *трет*-бутилоксикарбонилаланина (III) в 100 мл диоксана. Смесь перемешивали 48 ч при 20°, раствор упаривали до половины первоначального объема, охлаждали до 0° и подкисляли до pH 3 лимонной кислотой. Выпавшее масло экстрагировали (3 × 200 мл) этилацетатом, экстракт промывали 3 раза водой, высушивали и упаривали при 40°. Продукт хроматографировали на силикагеле, колонка размером 2 × 70 см в системе А. Выход 9,70 г (68%).

CF₃COOH·Ala-Pro-OH (VII). Кислоту (V) в количестве 2,86 г (10 ммоль) растворяли в 10 мл смеси трифторуксусной и уксусной кислот (1 : 3), через 30 мин упаривали досуха. К остатку добавляли 100 мл сухого эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали над KOH. Выход 2,94 г (98%).

Voc-Lys(Z)-Ala-Pro-OH (VIII) получили аналогично дипептиду (V), исходя из 4,5 г (9,4 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира N^α-*трет*-бутилоксикарбонил-(N^ε-бензилоксикарбонил)лизина (VI) и 2,9 г (9,6 ммоль) соединения (VII). Выход 4,80 г (93%), масло.

CH₃COOH·Lys(Z)-Ala-Pro-OH (X). Соединение (VIII) в количестве 5,48 г (10 ммоль) растворяли в 20 мл ледяной уксусной кислоты, добавляли 3,69 мл (30 ммоль) эфирата BF₃ и через 30 мин упаривали. К остатку добавляли 150 мл абс. эфира, осадок отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали над KOH. Выход 5,0 г (98%).

Voc-Cys(MBzl)-Lys(Z)-Ala-Pro-OH (XI) синтезировали аналогично соединению (V) из 4,38 г (10 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира *трет*-бутилоксикарбонил-(S-метоксибензил)цистеина (IX) и 5,58 г (11 ммоль) соединения (X) в диоксане в присутствии 2,82 мл (22 ммоль) триэтиламина Et₃N. Выход 5,30 г (69%).

Voc-Asn(Bzh)-Cys(MBzl)-Lys(Z)-Ala-Pro-OH (XIV) получили аналогично соединению (XI) из 0,50 г (1 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира бензгидрिलाспарагина (XII) и 0,80 г (1,1 ммоль) ацетата (XIII), приготовленного действием эфирата BF₃ в уксусной кислоте на 0,84 г (1,1 ммоль) тетрапептида (XI), как описано для пептида (X). Выход 0,6 г (57%).

Voc-Cys(MBzl)-Asn(Bzh)-Cys(MBzl)-Lys(Z)-Ala-Pro-OH (XVII). *трет*-Бутилоксикарбонил-(S-метоксибензил)цистеин (XV) в количестве 0,050 г (0,15 ммоль) и 1-оксисбензотриазол (0,02 г, 0,15 ммоль) растворяли в 8 мл абс. диоксана, охлаждали до 5°, добавляли 0,03 г (0,15 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 3 мл абс. диоксана и перемешивали 3 ч при 5°. Затем к раствору добавляли 0,16 г (0,16 ммоль) ацетата (XVI) (полученного из 0,17 г пентапептида (XIV) как описано выше) и 0,045 мл (0,32 ммоль) Et₃N и перемешивали 48 ч при 20°. Выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 50 мл этилацетата и после обычных промывок хроматографировали на силикагеле (колонка 2 × 30 см, система А). Выход аморфного порошка 0,101 г (53%).

Твердофазный синтез С-концевого ундекапептида (XVIII). Смесь 10 г (12,9 ммоль хлорметильных групп) хлорметилированного сополимера стирола и 2% дивинилбензола (Protein Research Foundation, Япония), 4 г (12,9 ммоль) N-*трет*-бутилоксикарбонил-(N¹⁰-динитрофенил)-гистидина и 1,8 мл (12,9 ммоль) Et₃N в 8 мл абс. этанола кипятили 24 ч при 80°. Образовавшийся аминоацилполимер промывали абс. этанолом, хлористым

метиленом, хлороформом, эфиром (каждый растворитель 3×50 мл) и высушивали. Содержание Вос-(Nⁱⁿ-динитрофенил)гистидина 0,52 ммоль/г полимера.

Наращивание пептидной цепи проводили на автоматическом синтезаторе с использованием следующего цикла обработки (начиная с удаления Вос-защиты):

Шаги 1—3. Промывка хлористым метиленом, хлороформом и этанолом ($3 \times 1,5$ мин).

Шаги 4—5. Обработка 25% раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле (2 \times 1,5 мин).

Шаги 6—8. См. шаги 1—3.

Шаг 9. Предварительная промывка 10% раствором Et₃N в хлористом метиле (1 \times 1,5 мин).

Шаг 10. Нейтрализация 10% Et₃N в хлористом метиле (1 \times 10 мин).

Шаги 11—13. См. шаги 1—3.

Шаг 14. Прибавление 1,5-кратного избытка Вос-аминокислоты в хлористом метиле (1 \times 5 мин).

Шаг 15. Прибавление 1,5-кратного избытка DCC в хлористом метиле (1 \times 1,5 мин).

Шаг 16. Перемешивание (1 \times 24 ч).

Шаг 17. Промывка хлористым метиленом (3 \times 1,5 мин).

Шаг 18. Промывка 5% раствором Et₃N в хлористом метиле (3 \times 1,5 мин).

Шаги 19—21. См. шаги 1—3.

Шаг 22. Прибавление Вос-аминокислоты (5,3 ммоль) в хлористом метиле (1 \times 5 мин).

Шаг 23. Прибавление DCC (5,3 ммоль) в хлористом метиле (1 \times 1,5 мин).

Шаг 24. Перемешивание (6 ч).

Шаги 25—27. См. шаги 1—3.

Шаг 28. Промывка диметилформамидом (3 \times 5 мин).

Шаг 29. Промывка хлористым метиленом (5 \times 20 мин).

Отщепление ундекапептида (XIX) от полимера. После высушивания пептидилполимер (XVIII) суспендировали в 200 мл метанола, суспензию насыщали NH₃ в течение 3 ч при 0° и выдерживали 24 ч при 20°. Полимер последовательно промывали этанолом, хлористым метиленом и диметилформамидом, фильтраты упаривали и осаждали из метанола. Полученный аморфный продукт очищали двукратной хроматографией на сефадексе LH-20 в диметилформамиде (рис. 1). Выход хроматографически индивидуального продукта 1,2 г.

CF₃COOH · Thr(Bzl) - Ala-Leu - Cys(MBzl) - Ala - Arg(Tos) - Arg(Tos) - Cys(MBzl) - Gln(Bzh) - Gln(Bzh) - His-NH₂ (XXI) получен аналогично соединению (VII) из 90 мг (0,040 ммоль) вещества (XIX) с выходом 96%. R_f 0,6 (B).

Voc - Glu(OBzl) - Thr(Bzl) - Ala-Leu - Cys(MBzl) - Ala - Arg(Tos) - Arg(Tos) - Cys(MBzl) - Gln(Bzh) - Gln(Bzh) - His-NH₂ (XXII). К раствору 87 мг (0,04 ммоль) соединения (XXI) в 4 мл пиридина добавляли 0,01 мл (0,08 ммоль) диизопропилэтиламина, перемешивали 15 мин при 20°. После этого добавляли 18,0 мг (0,04 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-(*O*-бензил)глутаминовой кислоты (XX) и перемешивали 48 ч при 20°. Реакционную смесь выливали при перемешивании в холодную воду (4°) и оставляли при 5° на 6 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и этилацетатом (5 \times 30 мл), а затем остаток хроматографировали на колонке с сефадексом LH-20 в диметилформамиде (рис. 2). Выход 58 мг (60%).

Voc - Cys(MBzl) - Asn(Bzh) - Cys(MBzl) - Lys(Z) - Ala-Pro-Glu(OBzl) - Thr(Bzl) - Ala-Leu - Cys(MBzl) - Ala - Arg(Tos) - Arg(Tos) - Cys(MBzl) - Gln(Bzh) - Gln(Bzh) - His-NH₂ (II). К раствору 120 мг (0,094 ммоль) гексапептида (XVII)

и 13 мг (0,095 ммоль) 1-оксibenзотриазола в 4 мл диметилформамида при охлаждении (0°) добавляли 20,6 мг (0,1 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 1 мл диметилформамида, перемешивали 3 ч при 0° и 2 ч при 20°, затем вносили 235 мг (0,096 ммоль) пептида (XXIII) (получен с выходом 98% из соединения (XXII) действием трифторуксусной кислоты), 0,025 мл (0,19 ммоль) диизопропилэтиламина и перемешивали 48 ч при 20°. Раствор упаривали до небольшого объема и к остатку добавляли 150 мл 4% раствора NaHCO₃ и 150 мл этилацетата. Этилацетатный слой промывали растворами 4% NaHCO₃ (2 × 30 мл), 2% лимонной кислоты (2 × 50 мл), водой, высушивали и упаривали. Остаток растворяли в диметилформамиде и хроматографировали на сефадексе LH-20 (рис. 3) с последующей рехроматографией основного продукта в тех же условиях. Выход хроматографически индивидуального пептида (II) 180 мг (54%).

Удаление защитных групп в октадекапептиде (II) и окисление сульфгидрильных групп — получение апамина (I). Из 38 мг (40 мкмоль) защищенного октадекапептида аналогично соединению (VII) получали трифтороацетат (37,5 мг, выход 98%), который в присутствии 1 г цистеина и 1 мл анизола обрабатывали 10 мл безводного HF (1 ч, 0°). После удаления HF остаток растворяли в 7 мл фосфатного буфера (рН 8,0) и выдерживали 10 ч при 20° с 1 г дитиотреита. После обессоливания (сефадекс G-10, 1 М уксусная кислота, колонка 2,5 × 50 см) элюат, содержащий пептидную фракцию, разбавляли 800 мл 0,1 М трис-HCl-буфера (рН 8,0) и оставляли при слабом перемешивании на 48 ч при 20° [14]. Подкисляли уксусной кислотой до рН 5,1 и хроматографировали на колонке с CM-целлюлозой CM-32, уравновешенной 0,05 М аммоний-ацетатным буфером, рН 5,1 (см. рис. 4). Полученный продукт затем хроматографировали на колонке с биорексом 70 (см. рис. 5), выход апамина (пик В, рис. 5) 0,21 мг (1%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Нуриджин А. Р., Елякова Е. Г., Малькова В. П., Цетлин В. И., Иванов В. Т. (1978) Биоорган. химия, 4, 1314—1321.
2. Schnabel E., Klostermeyer H., Berndt H. (1971) Liebigs Ann. Chem., 749, 90—108.
3. Merrifield R. B. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 2149—2154.
4. Merrifield R. B. (1964) Biochemistry, 3, 1385—1390.
5. Stewart J. M., Young J. D. (1969) in Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman W. H., ed.), San Francisco, California.
6. Sakakibara S. (1971) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins (Weinstein B., ed.), vol. 1, pp. 51—82, N. Y.
7. Sharp J. J., Robinson A. B., Kamen M. D. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 6097—6107.
8. Sano S., Kawanishi S. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 1380—1384.
9. Feinberg R. S., Merrifield R. B. (1975) J. Amer. Chem. Soc., 97, 3485—3496.
10. Торчинский Ю. М. (1977) Сера в белках, «Наука», М.
11. Aimoto S., Shimonishi Y. (1975) Bull. Chem. Soc. Japan, 48, 3293—3297.
12. Aimoto S., Shimonishi Y. (1976) Bull. Chem. Soc. Japan, 49, 317—320.
13. Rocchi R., Binassi C. A., Tomatis R., Ferroni R., Menegatti E. (1976) Int. J. Peptide Prot. Res., 8, 167—175.
14. Rietschoten J. Van., Granier C., Rochat H., Lissitzky S., Miranda F. (1975) Eur. J. Biochem., 56, 35—40.
15. Cosand W. L., Merrifield R. B. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 2771—2775.
16. Sandbekk B. E. B., Ragnarsson U. (1975) Int. J. Peptide Prot. Res., 7, 503—504.
17. Sakakibara S., Shimonishi Y., Kishida V., Okada M., Sugihara H. (1967) Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 2164—2167.

Поступила в редакцию
23.III.1978

SYNTHESIS OF APAMIN, A BEE VENOM NEUROTOXIN

NURIDDINOV A. R., ZHUKOVA G. F., TSETLIN V. I., IVANOV V. T.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The total synthesis has been performed of apamin, a neurotoxic component from bee venom. The protected octadecapeptide 1-18 was prepared by condensation of fragments (1-6) + (7-18), whereby the C-terminal peptide 8-18 was synthesized on a solid phase, and the N-terminal one 1-6 — by classical methods. The octadecapeptide deprotection was carried out by liquid HF in the presence of cysteine. After reoxidation, carboxymethylcellulose CM-32 and Bio-Rex 70 were employed for isolating the desired product — the conditions for these steps being previously found using naturally-occurring apamin. The synthetic peptide was identical to the latter according to the toxicity assay, CD data, amino acid composition, as well as ion-exchange, gel and thin-layer chromatography.
