



УДК 547.962.07

ИССЛЕДОВАНИЕ ПО СИНТЕЗУ  $\alpha$ -БУНГАРОТОКСИНАI. СИНТЕЗ ЗАЩИЩЕННОГО ГЕПТАТРИАКОНТАПЕПТИДА  
С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ (38—74)  $\alpha$ -БУНГАРОТОКСИНА \**Михалева И. И., Мягкова М. А., Жукова Г. Ф.,  
Иванов В. Т.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Осуществлен синтез защищенного гептатриаконтапептида, соответствующего аминокислотной последовательности 38—74 постсинаптического нейротоксина —  $\alpha$ -бунгаротоксина. Пептид получен конденсацией фрагментов, приготовленных ступенчатым наращиванием цепи с С-конца. Методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии и ГЖХ на асимметрической фазе проведена оценка степени рацемизации аминокислот, активируемых в ходе блочной конденсации.

В последние годы широко исследуется химия нейротоксинов, выделенных из ядов различных змей. Интерес к этим токсинам в основном связан с их способностью блокировать функционирование системы нервно-мышечной передачи за счет образования устойчивых комплексов с холинэргическим рецептором постсинаптической нервной мембраны. Это свойство используется в ряде лабораторий для выделения рецептора ацетилхолина, изучения его природы и исследования механизма синаптической передачи.

Как составная часть структурно-функционального исследования нейротоксинов, проводимого в нашем институте [1, 2], нами был предпринят полный синтез  $\alpha$ -бунгаротоксина \*\*, одного из нейротоксических компонентов яда тайваньской змеи *Bungarus multicinctus* [9], построенного из 74 аминокислотных остатков и содержащего 5 дисульфидных мостиков [10, 11] (рис. 1). Синтез  $\alpha$ -бунгаротоксина имел также целью разработку методов получения аналогов, необходимых для изучения связи между первичной структурой и биологической функцией в ряду нейротоксинов змеиных ядов и расширяющих возможности спектральных методов исследования пространственной структуры. Кроме того, предпринятое исследование представляет интерес для развития методов химического синтеза белковых веществ.

Как известно, существует два общих подхода к синтезу пептидов — классический (в растворе) и твердофазный. Учитывая трудности удаления

\* В работе приняты следующие нестандартные сокращения: MBzI — *n*-метоксибензил, VzI Cl<sub>2</sub> — 2,6-дихлорбензил, VzH — бензгидрил, Dnp — динитрофенил, Bu<sup>t</sup> — трет-бутил, Tos — тозил, НОВТ — 1-оксибензотриазол, ONSu — N-оксисукцинимид, DCC — дициклогексилкарбодимид, DCHA — дициклогексилламин, DMFA — диметилформамид, ТГФ — тетрагидрофуран.

\*\* Отдельные результаты исследования по синтезу  $\alpha$ -бунгаротоксина были доложены на международных и всесоюзных симпозиумах по химии пептидов и белков [1, 3—8].

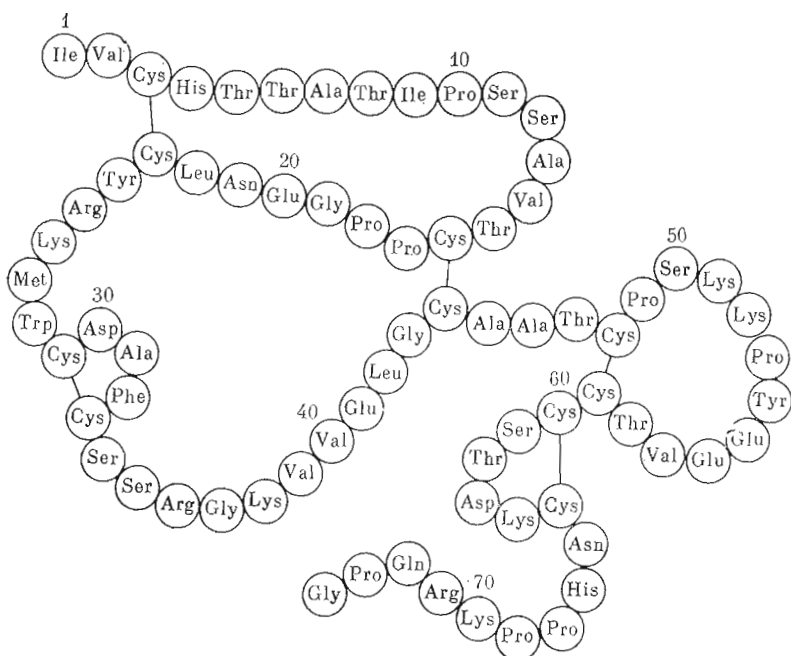


Рис. 1. Структура  $\alpha$ -бунгаротоксина

ложных последовательностей и доказательства индивидуальности полипептидов, получаемых твердофазным методом, мы остановили свой выбор на классическом пути синтеза в растворе, а именно на его варианте, предусматривающем использование максимального числа гидрофобных защитных групп для полифункциональных аминокислот. Тем самым мы рассчитывали свести к минимуму побочные реакции и улучшить растворимость защищенных пептидов в органических растворителях.

Выбранная схема синтеза включала получение четырех приблизительно равных по величине защищенных фрагментов 1—19, 20—37, 38—53 и 54—74 с С-концевыми остатками оптически неактивного глицина или практически не рацемизирующегося при активации пролина, их последующую конденсацию с получением защищенного пептида с последовательностью 1—74, удаление защитных групп и замыкание дисульфидных связей. В настоящей работе рассмотрен синтез фрагментов 38—53 и 54—74 и их конденсация в защищенный гептатриаконтанептид, отвечающий последовательности 38—74  $\alpha$ -бунгаротоксина.

В процессе синтеза в качестве «временной» защитной группировки для N-концевых аминогрупп применяли *трет*-бутилоксикарбонильную группу, для защиты боковых функций использовали следующие защитные группы: для серина и треонина — бензильную, для аргинина — тозилую, для аспарагина и глутамина — бензгидрильную, для цистеина — *n*-метоксибензильную, для лизина — бензилоксикарбонильную, для тирозина — 2,6-дихлорбензильную, для аспарагиновой и глутаминовой кислот — бензильные эфиры. Имидазольное кольцо гистидина пришлось оставить незащищенным, поскольку, как будет показано далее, ни одна из использованных нами защитных групп на первых этапах работы не оказалась достаточно устойчивой в условиях синтеза. Карбоксильную группу глицина-74 блокировали бензильным эфиром, карбоксильные группы остальных С-концевых аминокислот оставляли незащищенными, при проведении реакций конденсации эти группы защищали солеобразованием с третичными аминами или бикарбонатом натрия.

Указанный набор защитных групп в основном соответствовал «твердофазному набору», поэтому для удаления Вос-группы на промежуточных





пептидов. Индивидуальность пептидов контролировали тонкослойной хроматографией на пластинках с силикагелем в нескольких хроматографических системах, а также данными аминокислотного и элементного анализов.

Пептиды, полученные блочной конденсацией фрагментов, выделяли гельпроникающей хроматографией реакционной смеси (и ее рехроматографией при необходимости), после чего на аналитических колонках проводили анализ контрольных смесей выделенного продукта реакции с ~10% добавками каждого из исходных компонентов. Анализ кривых элюции (четкость разделения, количество пиков) в совокупности с результатами определения N-концевых аминокислотных остатков дансильным методом и данными аминокислотного анализа позволял судить о чистоте пептидов.

Рассмотрим ход синтеза. Защищенный пентапептид 70–74 получали исходя из бензилового эфира глицина (схема 2). К дипептиду (III), полученному карбодимидным методом, присоединяли аналогичным образом Boc-Gln(Bzh)-OH, Boc-Arg(Tos)-OH удавалось ввести в пептидную цепь с хорошим выходом только модифицированным методом смешанных ангидридов. При удалении Boc-группы с защищенного трипептида (IV) в реакционной смеси хроматографически были обнаружены, кроме нужного продукта, дипептид Gln(Bzh)-Pro-OH и глицин. Этот факт лишний раз иллюстрирует известную лабильность связи Pro-Gly [14] коротких пептидов в условиях удаления Boc-группы. Далее пентапептид (IV) был получен из тетрапептида (Va) и Boc-Lys(Z)-OH карбодимидным методом.

При получении пентапептида 65–69 (IX) было опробовано несколько схем синтеза из-за затруднений, возникших при присоединении гистидина к пролиновому дипептиду и связанных с отсутствием подходящей защитной группы для имидазольного кольца. Первоначально в качестве исходного продукта был выбран Boc-His(Dnp)-OH, исходя из которого карбодимидным методом были получены ди- и трипептид: Z-His(Dnp)-Pro-OBu<sup>t</sup> и Z-His(Dnp)-Pro-Pro-OBu<sup>t</sup>. Однако после удаления трет-бутильной и бензилоксикарбонильной групп и добавления третичных аминов или бикарбоната натрия для блокирования освободившегося карбоксила при последующей конденсации наблюдалось частичное отщепление динитрофенильной группы. В дальнейшем был использован Boc-His(Tos)-OH, который с высоким выходом присоединяли DCC/НОВТ-методом к пролиновому дипептиду. При образовании трипептида происходило удаление тозилльной группы освобождающимся в процессе реакции 1-оксибензотриазолом [15]. Защищенный аспарагин присоединяли к трипептиду (VII) DCC/НОВТ-методом. Далее тетрапептид (VIII) после снятия Boc-защиты конденсировали с Boc-Cys(MBzl)-ONSu. В ходе синтеза мы не обращали внимания на возможность образования амидинового производного по незащищенному имидазолу гистидина [16], поскольку по результатам опытов, проведенных нами на модельных соединениях, оно количественно регенерирует свободную имидазольную группу в условиях отщепления Boc-группировки:

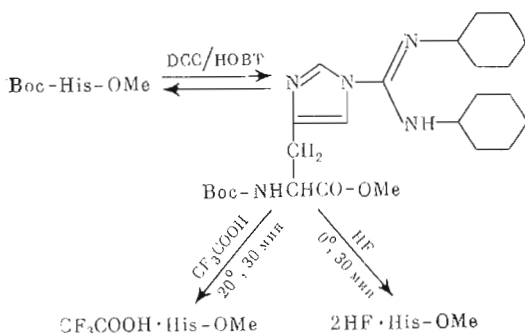
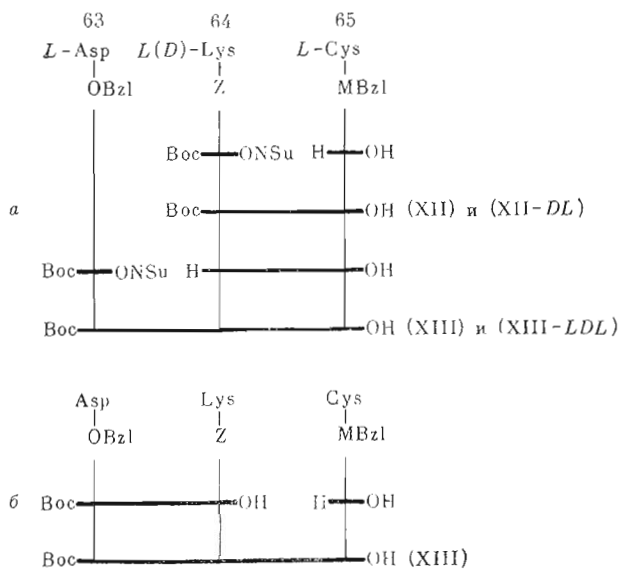


Схема 3



Синтез модельных трипептидов (XIII) и (XIII-*LDL*) последовательным удлинением цепи (*a*) и конденсацией типа (1+1)+1 (*b*)

Синтез трипептида (XI) осуществляли последовательным наращиванием цепи методом *N*-оксисукцинимидных эфиров. Так как при сборке молекулы конденсацию предполагалось проводить по оптически активному аминокислотному остатку лизина, целесообразно было оценить степень рацемизации при проведении реакции DCC/НОВТ-методом. С этой целью двумя способами был синтезирован модельный трипептид Boc-Asp(OBzl)-Lys(Z)-Cys(MBzl)-OH (XIII) (схема 3): последовательным удлинением цепи с *C*-конца (путем, исключаяющим рацемизацию) и конденсацией Boc-Asp(OBzl)-Lys(Z)-OH с Cys(MBzl)-OH DCC/НОВТ-методом, т. е. с сохранением возможности рацемизации. Кроме того, по схеме 1+(1+1) получали диастереомер указанного трипептида с *LDL*-конфигурацией (XIII-*LDL*). Сравнение спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР *LLL*- и *LDL*-изомеров и их смесей, содержащих 5% *LDL*- и 1% *LDL*-изомера со спектрами трипептида, полученного DCC/НОВТ-методом по схеме (1+1)+1 из *L*-аминокислот, представляющей собой модель будущей конденсации фрагментов, приводит к выводу, что степень рацемизации в этом случае не превышает 1% (рис. 2).

Октапептид 54–61 (XXI) получали как ступенчатым наращиванием цепи с *C*-конца методом активированных эфиров (схема 4), так и конденсацией тетрапептидов (XVI) (после снятия Boc-группы) и (XXIV) (схема 2). Последний способ получения октапептида (XXI) оказался более удобным для наработки препаративных количеств октапептида благодаря легкости хроматографического контроля и возможности эффективного использования гель-фильтрации на сефадексе LH-20 при выделении этого пептида. На рис. 3а показана кривая элюции, соответствующая делению реакционной смеси; пептид, выходящий в заштрихованном объеме, далее подвергался рехроматографии. При этом выделяли пептид, хроматографический профиль которого на аналитической колонке изображен на рис. 3б. На рис. 3в, г приведены кривые элюции контрольных смесей выделенного октапептида с исходными тетрапептидами. Приведенная картина разделения соединения (XXI) с исходными компонентами в совокупности с данными определения *N*-концевых аминокислот дансильным

Вос-Asp(OBzl)-Lys(Z)-Cys(MBzl)-OH

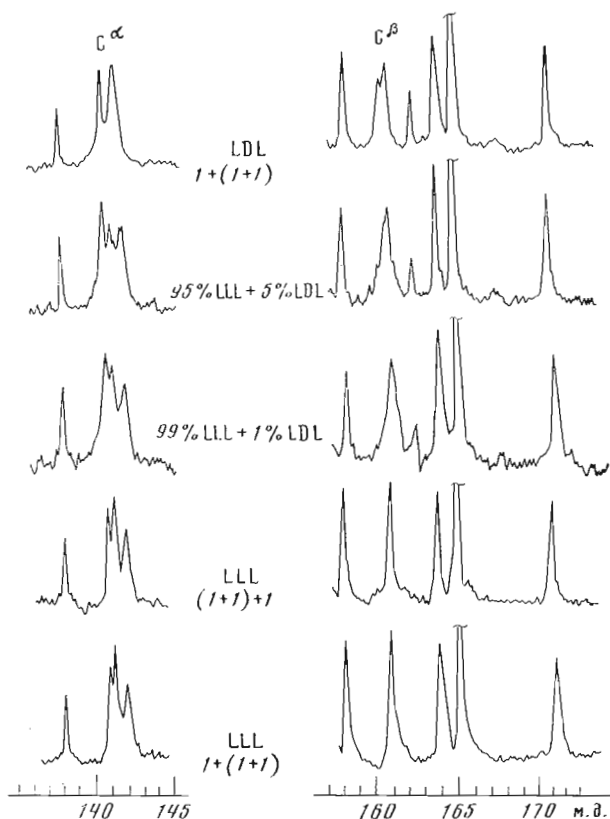
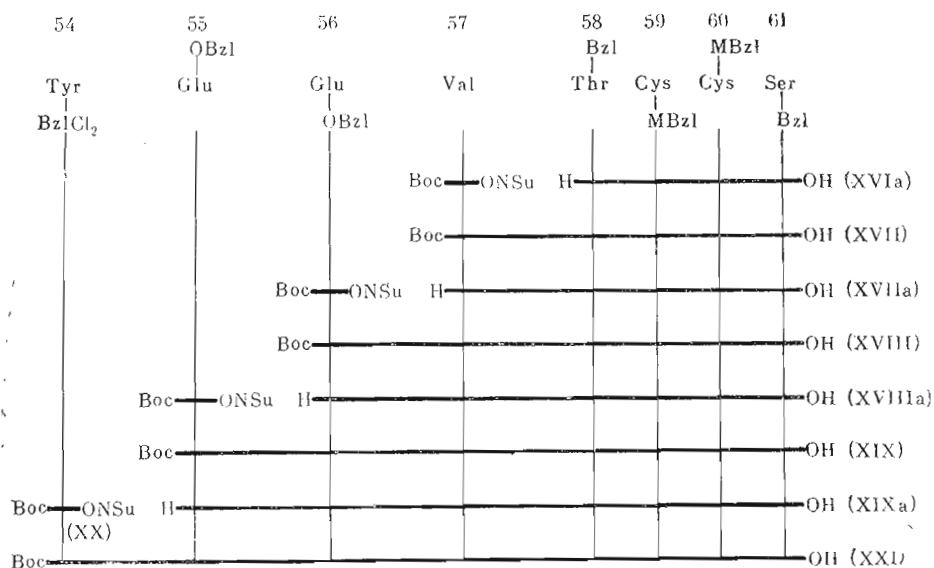


Рис. 2. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР трипептидов Вос-Asp(OBzl)-Lys(Z)-Cys(MBzl)-OH LLL- и LDL-конфигурации и их модельных смесей

методом и аминокислотным анализом позволяет гарантировать чистоту получаемого октапептида.

Конденсация тетрапептидов (XXIV) и (XVI) (схема 2) проходила по оптически активному аминокислотному остатку — валину-57, поэтому необходимо было определить степень рацемизации этого остатка при соединении двух фрагментов. Для оценки рацемизации здесь и далее был использован метод газожидкостной хроматографии на асимметрической фазе, а именно его модификация, разработанная С. В. Виттом и сотр. [17, 18]. В качестве неподвижной фазы использовали циклогексильный эфир N-трифторацетилвалилвалина, аминокислоты анализировали в форме изопропиловых эфиров N-трифторацетильных производных. Исследуемый пептид деблокировали фтористым водородом при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 ч, далее проводили кислотный гидролиз в относительно мягких условиях (12 ч,  $100^\circ\text{C}$ ) и полученную смесь переводили в упомянутые выше производные. Определение площадей пиков, полученных на капиллярных колонках с пламенно-ионизационным детектором, осуществляли на электронных интеграторах. На рис. 4 изображена хроматограмма, полученная при определении рацемизации валина-57, из которой видно, что степень рацемизации в этом случае не превышала 1%. Необходимо отметить, что попытка использовать для получения смеси аминокислот прямой кислотный гидролиз защищенных пептидов (минуя стадию деблокирования фтористым водородом) привела к появлению в гидролизате 20–30% D-валина и D-серина. Причина рацемизации в условиях гидролитическо-

Схема 4



Синтез октапептида 54–61 последовательным наращиванием цепи

го отщепления защитных групп остается неясной, но можно с определенностью утверждать, что эти условия непригодны для анализа оптической чистоты продуктов.

Ундекапептид (XXV) получали конденсацией трипептида 62–64 и октапептида 54–61 DCC/НОВТ-методом и выделяли гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в диметилформамиде (рис. 5). Как видно из рисунка, разделение здесь затруднено из-за близости молекулярных весов ундека- и октапептидов (рис. 5в). Чистота полученного продукта (XXV) подтвердилась результатами анализа N-концевых остатков и аминокислотного анализа.

При сборке сегмента (54–74) были опробованы различные варианты соединения полученных фрагментов. Так, например, пентапептид 65–69 конденсировали с трипептидом 62–64 DCC/НОВТ-методом, при этом выход пептида 62–69 оказался очень низким. Более рациональной оказалась другая схема соединения фрагментов. С-Концевой пентапептид, карбоксил которого имел защитную эфирную группу, конденсировали DCC/НОВТ-методом с пентапептидом 65–69 (схема 2); при этом использовали избыток активирующих реагентов. Декапептид 65–74 (XXVI) выделяли гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле (рис. 6). Далее к полученному декапептиду после снятия Boc-защитной группы присоединяли ундекапептид 54–64 (XXV) с помощью отработанного и проверенного на модельных соединениях DCC/НОВТ-метода (схема 2). Очистку полученного генейкозапептида проводили на сефадексе LH-20 в диметилформамиде. Сравнение кривых элюции пептида, получаемых при делении реакционной смеси, с кривой, отвечающей искусственной смеси генейкозапептида (XXVII) с ундекапептидом (XXV), свидетельствовало об отсутствии этого исходного компонента в продукте. Примесь декапептида также не была обнаружена при определении N-концевых остатков. Полученный генейкозапептид обрабатывали 1 ч жидким фтористым водородом при 0° С в присутствии анизол. Далее проводили определение N-концевых аминокислот, не обнаружившее признаков разрыва пептидных связей. Кроме того, осуществляли кислотный гидролиз этого пептида и определяли аминокислотный состав, причем содержание всех аминокислотных остатков, в том числе и глутаминовой кислоты, в этом случае соответствовало теоретическому. Этот факт свидетельствовал об отсут-



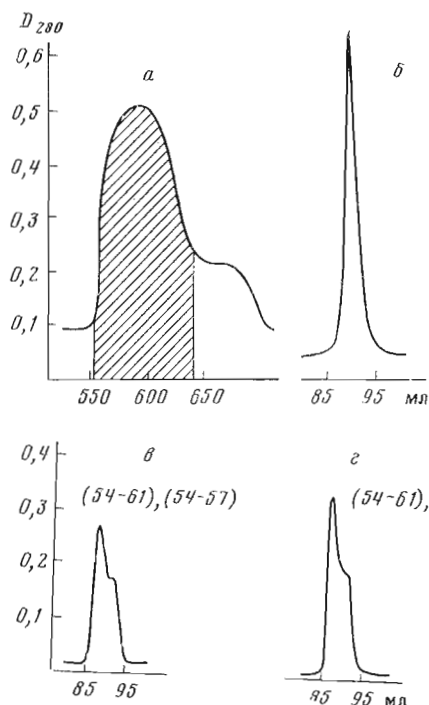


Рис. 3. Хроматографический профиль деления октапептида 54-61 на колонке с сефадексом LH-20 в диметилформамиде: *a* - колонка 3×160 см (заштрихована выделяемая фракция), *б* - рехроматография выделенной фракции на колонке 1,7×70 см, *в* - в присутствии 10% исходного тетрапептида 54-57, *г* - в присутствии 10% исходного тетрапептида 58-61

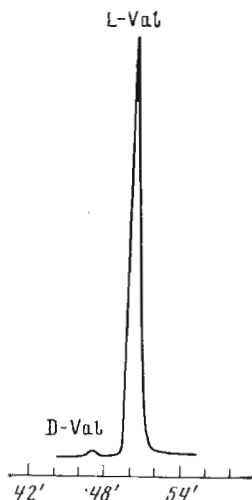


Рис. 4

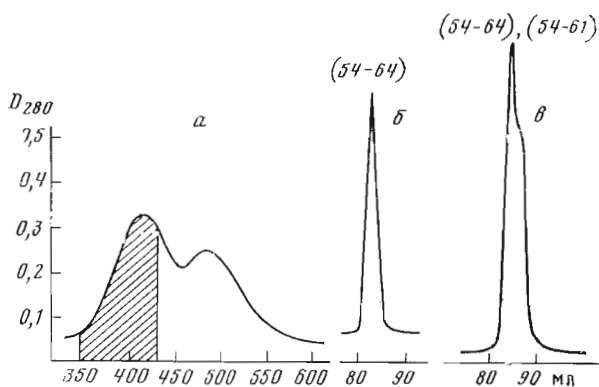


Рис. 5

Рис. 4. Профиль газохроматографического определения степени рацемизации Val-57 при синтезе октапептида 54-61.  $S_{D-Val}$ ,  $S_{L-Val}$  - площади пиков *D*-Val и *L*-Val, равные соответственно 296 и 31514. Содержание *D*-Val 0,9%

Рис. 5. Профиль гель-фильтрации ундекапептида 54-64 на сефадексе LH-20 в диметилформамиде: *a* - колонка 30×130 см (заштрихована выделяемая фракция), *б* - рехроматография на колонке 1,7×70 см, *в* - анализ контрольной смеси ундекапептида с исходным октапептидом 54-61

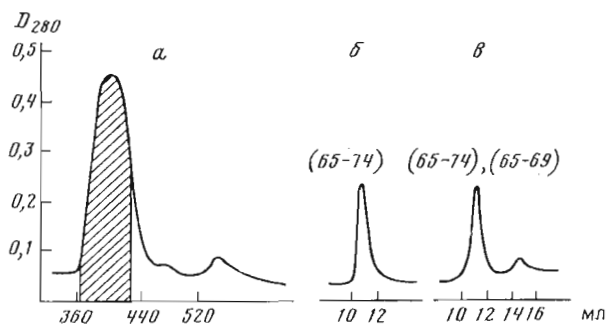


Рис. 6. Хроматографический профиль деления декапептида 65-74 на колонке с сефадексом LH-20 в метаноле: *a* - колонка 2,6×180 см (заштрихована выделяемая фракция), *б* - рехроматография на аналитической колонке 1,2×40 см, *в* - анализ контрольной смеси декапептида с пентапептидом 65-69

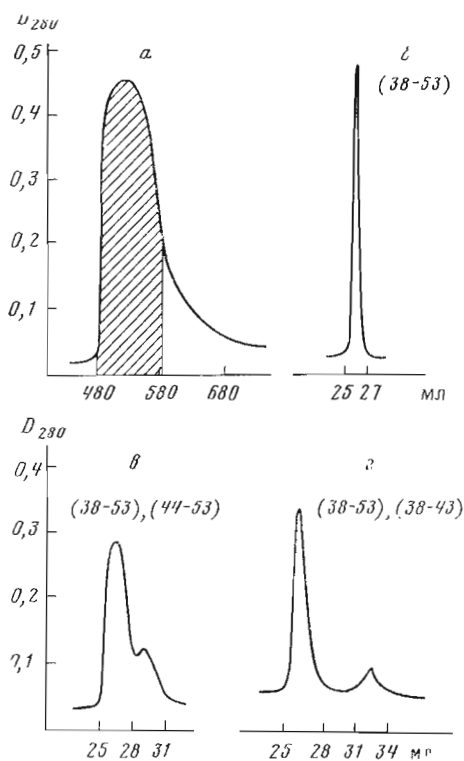


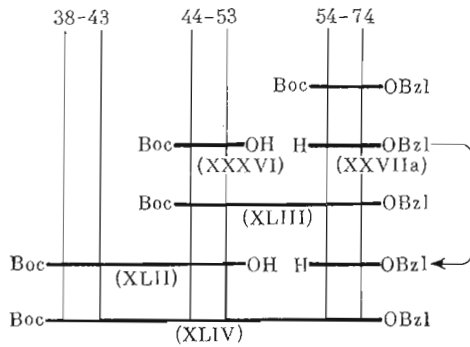
Рис. 7. Кривая элюции гексадекапептида (XLII) на колонке с сефадексом LH-20 в диметилформамиде: *a* - деление реакционной смеси на колонке 3,0×160 см (заштрихована выделяемая фракция), *б* - анализ выделенной фракции на аналитической колонке 1,2×60 см, *в*, *г* - анализ контрольных смесей гексадекапептида с исходными компонентами

вид заметных количеств *S*-арильных производных глутаминовой кислоты, образование которых возможно при обработке глутамилсодержащих пептидов безводным фтористым водородом в присутствии анизол [9].

Для синтезированного геникозапептида 54-74 (XXVII) было проведено ГЖХ-определение степени рацемизации остатка серина-61, подвергавшегося активации при блочной конденсации пептидных фрагментов 54-61 и 62-64 ДСС/НОВТ-методом.



С х е м а 6



Синтез пептида 38-74

Установлено, что степень рацемизации в этом случае не превышала 1,5%.

Синтез гексапептида 44-49 (XXXV) и тетрапептида 50-53 (XXX) осуществляли последовательным присоединением защищенных аминокислот к С-концевому пролину методом N-оксисукцинимидных эфиров (схема 5). Конденсацией пептидов (XXXV) и (XXXa) был получен декапептид (XXXVI). Очистку полученного продукта проводили гель-фильтрацией на сефадексе LH-20. В ходе синтеза защищенного пептида 38-43 (схема 5) трудности при очистке промежуточных пептидов возникли лишь на стадии отделения конечного гексапептида от остатков непрореагировавшего аминоконпонента, который был удален при использовании макропористой ионообменной смолы амберлит XE-89 в водном диметилформамиде. Конденсацией декапептида 44-53 (XXXVIa) и гексапептида (XLI) DCC/НОВТ-методом получен защищенный гексадекапептид 38-53 (XLII), выделенный в чистом виде гель-хроматографией на сефадексе LH-20 в диметилформамиде (рис. 7). Четкое отделение гексадекапептида от аминного и карбоксильного компонента с учетом данных аминокислотного и N-концевого анализа свидетельствовало о чистоте полученного гексадекапептида (XLII).

В поисках оптимального пути синтеза пептида с аминокислотной последовательностью, соответствующей С-концевой половине всей последовательности молекулы  $\alpha$ -бунгаротоксина, была проведена DCC/НОВТ-методом конденсация пептида 54-74 (XXVIIa) как с декапептидом 44-53 (XXXVI), так и с гексадекапептидом 38-53 (XLII) (схема 6). В том и другом случае реакции проходили с высоким выходом и не наблюдалось трудностей, связанных с недостаточной растворимостью; в результате были получены 31- и 37-членные пептиды.

В соответствии с результатами синтеза N-концевых фрагментов\* был осуществлен синтез в препаративных количествах гептатриаконтапептида 38-74 (XLIV) конденсацией гексадекапептида 38-53 и гейнейкозапептида 54-74. Реакцию конденсации проводили в диметилформамиде при эквимольных соотношениях реагентов.

Продукт реакции переосаждали из диметилформамида метанолом, подвергали гель-хроматографии на колонке со смолой Bio-Beads S-X1 в диметилформамиде (молекулярная масса полученного пептида была выше предела эксклюзии геля сефадекса LH-20). При определении N-концевых аминокислот дансильным методом (после обработки трифторуксусной

\* См. следующие сообщения.

кислотой в течение 1 ч) было обнаружено N<sup>α</sup>-дансильное производное лизина и следы N<sup>α</sup>, N<sup>ε</sup>-дидансильного производного лизина, но не было обнаружено следов дансилтирозина-54. Аминокислотный состав продукта соответствовал теоретическому.

Таким образом, был получен защищенный гептатриаконтанептид 38—74 (XLIV), соответствующий С-концевой половине аминокислотной последовательности молекулы α-бунгаротоксина; этот пептид был использован в дальнейших исследованиях.

### Экспериментальная часть

В работе использованы аминокислоты и некоторые их производные фирм Reanal и Serva. Основная часть необходимых производных была приготовлена по известным методикам [20, 21]. Тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинках с закрепленным слоем силикагеля фирм Merck, Eastman Kodak в хроматографических системах, приведенных в табл. 1. Для колоночной хроматографии использовали силикагель L5/40, 40/100 и 100/160 ммк (Chemapol), а также сефадекс LH-20 (Pharmacia) и стирол-дивинилную смолу Bio-Beads S-X1 (Bio-Rad); в качестве детектирующего прибора использовали Uvicord II (LKB, Швеция). Физико-химические константы соединений приведены в табл. 2, удельное вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 141 (США), все приведенные точки плавления не исправлены. Количественный аминокислотный анализ осуществляли на приборах BC-200 (Bio-Cal, ФРГ) и D-500 (Durrum, США), гидролиз пептидов проводили стандартным образом (6 н. HCl, 24 ч). Заниженные данные аминокислотного анализа защищенных пептидов, полученные для ряда аминокислот (Ser, Thr, Cys, Tyr), связаны, вероятно, с их деструкцией, окислением, алкилированием и неполным удалением защитных групп в ходе кислотного гидролиза или повышенной устойчивостью пептидных связей (Val-Val). Особенно низкие значения получали при стандартных условиях гидролиза для цистеина и тирозина при анализе пептидов, содержащих остатки Cys(MBzl) и Tyr(BzlCl<sub>2</sub>). Аналогичные результаты были получены при контрольных определениях этих аминокислот, выполненных для Boc-Cys(MBzl)-OH, Boc-Tyr(BzlCl<sub>2</sub>)-OH и ряда коротких пептидов: 60—70% для цистеина (с учетом цистеновой кислоты) и 48—55% для тирозина. Процентное содержание L- и D-аминокислот в гидролизатах определяли с помощью газожидкостного хроматографа «Цвет-5» при использовании интеграторов «Хромалог-2» и Varian-480. Спектры <sup>13</sup>C-ЯМР сняты на приборе Varian XL 100 (США) на частоте 25,5 МГц в растворе CDCl<sub>3</sub>, химические сдвиги измерены относительно сигнала CS<sub>2</sub>.

Все используемые растворители предварительно перегоняли, растворители, применявшиеся при проведении реакций конденсации, абсолютировали обычным образом [22]. Для небольших пептидов (вплоть до пентапептидов) проводили элементный анализ, результаты которого удовлетворительно соответствовали теоретическим значениям.

1. *Boc-Gln(Bzh)-OBzl (I)*. 6,74 г (20,0 ммоль) Boc-Glu-OBzl растворяли в 70 мл смеси диоксан — этилацетат, добавляли раствор бензгидрил-амин в 20 мл диоксана, охлаждали до 0°С и при энергичном перемешивании добавляли раствор 4,12 г (20,0 ммоль) DCC в 10 мл этилацетата. Перемешивали 1 ч при 0°С и 1 сут при 20°С. Дициклогексимочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, 10% раствором лимонной кислоты и снова водой. Раствор высушивали над MgSO<sub>4</sub>, упаривали, полученный остаток перекристаллизовывали из этилацетата. Выход бензилового эфира (I) 8,44 г (80%).

2. *Boc-Gln(Bzh)-OH (II)*. 8,44 г (16,0 ммоль) соединения (I) растворяли в 85 мл абс. ТГФ, добавляли палладиевую чернь и гидрировали 4 ч при

20° С. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 30 мл этилацетата и экстрагировали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водный раствор подкисляли лимонной кислотой, продукт экстрагировали этилацетатом, высушивали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали. Выход кислоты (II) 6,24 г (91%).

3. *Voc-Pro-Gly-OBzl (III)*. 14,62 г (68,0 ммоль) *Voc-Pro-OH* и 22,8 г (68 ммоль) *TosOH-Gly-OBzl* суспендировали в 50 мл диоксана, охлаждали до 0° С, при перемешивании добавляли 14,01 г (68,0 ммоль) DCC в 15 мл диоксана и 9,53 мл (68,0 ммоль)  $\text{Et}_3\text{N}$ . Смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 1 сут при 20° С. Дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали так же, как в опыте 2, высушивали  $\text{MgSO}_4$  и упаривали. Получали 17,23 г дипептида (III) (70%).

4. *Voc-Gln(Bzh)-Pro-Gly-OBzl (IV)*. 5,0 г (13,81 ммоль) дипептида (III) растворяли в 25% растворе трифторуксусной кислоты в хлористом метиле, выдерживали 30 мин при 20° С, упаривали, остаток промывали абс. эфиром, затем переосаждали из метанола эфиром. Выход трифторацетата (IIIa) 4,80 г (92%).

4,8 г (12,76 ммоль) трифторацетата (IIIa) и 5,25 г (12,0 ммоль) соединения (II) растворяли в 70 мл абс. диоксана, добавляли при 0° С 2,5 мл (13,2 ммоль) *N*-этилморфолина и 2,5 г (12,0 ммоль) DCC в 5 мл диоксана. Перемешивали 1 сут при 20° С, упаривали, добавляли 100 мл этилацетата, отфильтровывали дициклогексилмочевину, фильтрат промывали, как описано в опыте 2, высушивали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (30×500 мм) с силикагелем в хлороформе, используя элюцию в градиенте растворителей хлороформ — этилацетат — метанол. Получали 3,90 г (48%) пептида (IV). Аминокислотный анализ: Pro 1,1 (1), Gly 1,0 (1), Glu 1,0 (1).

5. *Voc-Arg(Tos)-Gln(Bzh)-Pro-Gly-OBzl (V)*. 1,50 г (2,19 ммоль) трипептида (IV) растворяли в 10 мл 25% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле, выдерживали 30 мин и упаривали. Остаток многократно промывали абс. эфиром. Выход трифторацетата (IVa) 1,51 г (99%).

К раствору 0,49 г (1,40 ммоль) *Voc-Arg(Tos)-OH* в 5 мл ТГФ добавляли 0,15 мл (1,40 ммоль) *N*-метилморфолина, охлаждали до -15° С и добавляли 0,19 мл (1,4 ммоль) изобутилхлорформата, перемешивали при -15° С 1—2 мин, затем по каплям прибавляли раствор, содержащий 0,97 г (1,40 ммоль) (IVa) и 0,15 мл (1,40 ммоль) *N*-метилморфолина в 5 мл ТГФ. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 3 ч при 20° С. Растворитель упаривали, к остатку добавляли этилацетат и промывали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, 10% раствором лимонной кислоты и снова водой. Этилацетатный слой высушивали  $\text{MgSO}_4$  и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (20×400 мм) с силикагелем в  $\text{CHCl}_3$ , используя элюцию в градиенте растворителей хлороформ — этилацетат — метанол. Выход пептида (V) 0,91 г (64%). Аминокислотный анализ: Arg 1,0 (1), Glu 1,1 (1), Pro 1,0 (1), Gly 1,0 (1).

6. *Voc-Lys(Z)-Arg(Tos)-Gln(Bzh)-Pro-Gly-OBzl (VI)*. 1,01 г (1,00 ммоль) тетрапептида (V) растворяли в 10 мл 2 н. HCl в диоксане, выдерживали 15 мин при 20° С, затем упаривали. Остаток переосаждали из метанола абс. эфиром. Выход хлоргидрата (Va) 0,90 г (95%). 0,50 г (1,31 ммоль) *Voc-Lys(Z)-OH* и 1,24 г (1,31 ммоль) соединения (Va) растворяли в 15 мл диоксана, охлаждали до 0° С, добавляли 0,18 мл (1,31 ммоль)  $\text{Et}_3\text{N}$  и 0,27 г (1,31 ммоль) DCC в 5 мл диоксана. Перемешивали 1 ч при 0° С и 1 сут при 20° С. Растворитель упаривали, добавляли этилацетат, промывали аналогично опыту 5, высушивали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Оставшееся масло хроматографировали на колонке (20×700 мм) с силикагелем, используя элюцию в градиенте растворителей хлороформ — этилацетат — метанол. Выход пептида (VI) 0,98 г (54%). Аминокислотный анализ: Lys 0,9 (1), Glu 0,9 (1), Pro 1,0 (1), Gly 1,0 (1), Arg 1,0 (1).

Таблица 1

## Условия тонкослойной хроматографии

Растворитель	Объемные соотношения компонентов и тип пластинок *																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
	а	а	а	б	б	б	а	а	а	б	а	а	б	а	а	а	а	б	а	а	б	б	б
Бензол	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Хлороформ	20	—	—	—	—	10	10	1	—	13	6	—	—	—	—	—	46	20	15	5	2	5	—
Этилацетат	10	—	—	3	2	—	2	2	—	6	3	5	—	1	—	—	—	10	10	5	—	10	—
Метанол	3	1	—	1	2	10	1	1	—	2	1	1	—	—	—	5	2	6	3	5	1	10	—
n-Бутанол	—	—	4	—	—	—	—	—	4	—	—	—	20	—	50	—	—	—	—	—	—	—	10
Ацетон	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Пиридин	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	—	—	—	—	—	—	—	—
Уксусная кислота	—	—	1	—	—	1	—	—	1	1	—	—	1	—	20	—	—	1	—	1	—	—	—
Диоксан	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	10	—	—	—	1	—	—	—	—	—	10
Вода	—	—	1	—	—	—	—	—	5	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	—	2	3
25% NH <sub>4</sub> OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	10

\* Буквами «а», «б» обозначены типы пластинок с закрепленным слоем силикагеля: а — Eastman, б — Merck.

Константы синтезированных соединений

Соединения	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$ , град	$R_f$ (система)	Соединения	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$ , град	$R_f$ (система)
(I)	110-111	-5,7 (с 0,9, ДМФА)	0,86(1) 0,72(2)	(XII)	Масло	-11,9 (с 1,4, MeOH)	0,52(8) 0,82(3)
(II)	69-73	-4,0 (с 0,8, ДМФА)	0,68(1) 0,55(2)	(XIII)	70-73	-23,2 (с 1, AcOH)	0,65(8) 0,61(12)
(III)	64-65	-44,4 (с 1, этанол)	0,52(2) 0,74(4)	(XIV)	110-114	-6,7 (с 1, MeOH)	0,85(3) 0,52(14)
(IV)	Аморфн.	+10,0 (с 1, этанол)	0,40(1) 0,38(2)	(XV)	56-62	-18,1 (с 1, MeOH)	0,72(8) 0,47(14)
(V)	105-107	+11,0 (с 0,1, этанол)	0,27(2) 0,57(8)	(XVI)	69-71	-22,0 (с 1,4, MeOH)	0,59(5) 0,83(8)
(VI)	Аморфн.	-23,9 (с 1, ДМФА)	0,54(8) 0,43(11)	(XVII)	108-112	-15,2 (с 1, AcOH)	0,51(17) 0,42(16)
(VII)	45-50	-39,4 (с 0,91, ДМФА)	0,52(9) 0,85(6)	(XVIII)	122-126	-2,5 (с 0,5, AcOH)	0,75(15) 0,40(17)
(VIII)	108-110	-32,0 (с 0,53, ДМФА)	0,29(3) 0,62(6)	(XIX)	147-150 (разл.)	-20,7 (с 1, AcOH)	0,68(13) 0,32(10)
(IX)	152-159 (разл.)	-37,8 (с 1, ДМФА)	0,72(10) 0,57(11)	(XX)	155-157	-8,0 (с 0,5, ДМФА)	0,81(19) 0,76(7)
(X)	42-45	-2,9 (с 0,6, MeOH)	0,41(14) 0,65(8)	(XXI)	162 (разл.)	12,9 (с 0,9, ДМФА)	0,31(10) 0,55(18)
(XI)	128-131	+5,2 (с 1, MeOH)	0,55(12) 0,69(8)				



Продолжение табл. 2

Соединения	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$ , град	$n_D^{20}$ (система)	Соединения	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$ , град	$n_D^{20}$ (система)
(XXII)	Масло	-44,0 (с 1, ДМФА)	0,52 (8) 0,79 (11)	(XXXIII)	80-81	-66,4 (с 0,4, этанол)	0,46 (2) 0,49 (11)
(XXIII)	»	-53,5 (с 1, ДМФА)	0,43 (8) 0,81 (6)	(XXXIV)	107-110	-107,3 (с 0,4, этанол)	0,36 (2) 0,50 (11)
(XXIV)	70-72	-69,0 (с 1, ДМФА)	0,62 (5) 0,34 (3)	(XXXV)	125-127	-68,2 (с 0,4, этанол)	0,23 (2) 0,37 (10)
(XXV)	193 (разл.)	-11,1 (с 1, ДМФА)	-	(XXXVI)	118-119	-11,0 (с 0,4, ДМФА)	0,21 (2) 0,89 (3)
(XXVI)	105 (разл.)	-29,3 (с 0,9, ДМФА)	-	(XXXVII)	116-118	-38 (с 0,7, диоксан)	0,75 (7) 0,80 (19)
(XXVII)	182 (разл.)	-19,4 (с 0,6, ДМФА)	-	(XXXVIII)	117-119	-19,6 (с 0,5, диоксан)	0,40 (20) 0,65 (7)
(XXVIII)	63-65	-35,1 (с 1, этанол)	0,57 (2) 0,85 (11)	(XXXIX)	128-130	-53,5 (с 1, диоксан)	0,60 (7) 0,55 (11)
(XXIX)	60-61	-56,2 (с 0,4, этанол)	0,18 (2) 0,69 (8)	(XL)	147-148	-51,8 (с 0,7, диоксан)	0,81 (21) 0,73 (23)
(XXX)	70-71	-36,3 (с 0,4, ДМФА)	0,79 (11) 0,59 (2)	(XLI)	>200	-86,0 (с 0,3, ДМФА)	0,60 (22) 0,53 (23)
(XXXI)	137,5-140 (ДСНА-соль)	-16,2 (с 0,4, этанол)	0,37 (2) 0,40 (11)	(XLII)	130 (разл.)	-31,1 (с 0,4, ДМФА)	-
(XXXII)	Аморфн.	-82,0 (с 0,4, этанол)	0,43 (2) 0,71 (11)	(XLIII)	210 (разл.)	-28,4 (с 0,4, ДМФА)	-
				(XLIV)	210 (разл.)	-36,6 (с 0,4, CF <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)	-

7. *Woc-His-Pro-Pro-OH (VII)*. 1,67 г (4,10 ммоль) *Woc-His(Tos)-OH* растворяли в 5 мл ДМФА, охлаждали до  $-15^{\circ}\text{C}$  и прибавляли 0,55 г (4,10 ммоль) НОВТ и 0,84 г (4,1 ммоль) ДСС. Выдерживали 1 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и прибавляли 1,20 г (4,1 ммоль) бромгидрата пролилпролина и 0,91 мл (8,3 ммоль) *N*-метилморфолина. Реакционную смесь выдерживали 2 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и 1 сут при  $20^{\circ}\text{C}$ . Растворитель упаривали, подкисляли уксусной кислотой до pH 3 и осаждали смесью этилацетат — эфир (1 : 1). Полученное масло растворяли в воде, промывали этилацетатом. Водный слой упаривали, остаток растворяли в метаноле и пересаждали этилацетатом. Выход пептида (VII) 1,01 г (55%).

8. *Woc-Asn(Bzh)-His-Pro-Pro-OH (VIII)*. 2,90 г (6,46 ммоль) трипептида (VII) растворяли в 30 мл 25% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле, выдерживали 30 мин, упаривали, промывали абс. эфиром, затвердевшее масло пересаждали из метанола этилацетатом. Выход трифторацетата (VIIa) 2,0 г (67%). К раствору 3,07 г (6,60 ммоль) соединения (VIIa) в 10 мл ДМФА добавляли при охлаждении 2,62 г (6,60 ммоль) *Woc-Asn(Bzh)-OH* и 1,36 г (6,60 ммоль) ДСС, выдерживали 1 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и 1 сут при  $20^{\circ}\text{C}$ . ДМФА упаривали, подкисляли уксусной кислотой и осаждали тетрапептид эфиром. Остаток хроматографировали на колонке (30×700 мм) с силикагелем, уравновешенной  $\text{CHCl}_3$ , используя элюцию в градиенте растворителей хлороформ — этилацетат — метанол. Выход пептида (VIII) 3,09 г (62%). Аминокислотный анализ: Asp 1,1 (1), His 0,9 (1), Pro 1,9 (2).

9. *Woc-Cys(MBzl)-Asn(Bzh)-His-Pro-Pro-OH (IX)*. 0,51 г (0,70 ммоль) пептида (VIII) растворяли в 20 мл 25% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле, выдерживали 40 мин, упаривали, остаток промывали абс. эфиром и пересаждали из метанола эфиром. Выход трифторацетата (VIIIa) 0,43 г (83%).

К раствору 0,59 г (0,80 ммоль) соединения (VIIIa) в ДМФА прибавляли 0,17 мл (1,6 ммоль) *N*-метилморфолина, охлаждали до  $0^{\circ}\text{C}$  и прибавляли 0,32 г (0,8 ммоль) *Woc-Cys(MBzl)-ONSu* в 5 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и 3 сут при  $20^{\circ}\text{C}$ . Затем реакционную массу подкисляли  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , растворитель упаривали и остаток хроматографировали на колонке (15×300 мм) с силикагелем в хлороформе с градиентом смеси этилацетат — метанол (1 : 3). Выход пептида (IX) 0,50 г (62%). Аминокислотный анализ: Asp 1,0 (1), His 0,9 (1), Pro 1,8 (2), Cys 0,7 (1).

10. *Woc-Asp(OBzl)-Lys(Z)-OH (X)*. 1,4 г (5,0 ммоль) *N*<sup>ε</sup>-бензилонскарибониллизина растворяли в 50 мл воды, приливали 0,42 г (5,0 ммоль)  $\text{NaHCO}_3$ . К полученному раствору добавляли раствор 2,1 г (5,0 ммоль) *Woc-Asp(OBzl)-ONSu* в диоксане (50 мл). Реакционную смесь перемешивали 3 сут. Растворитель упаривали, подкисляли при охлаждении лимонной кислотой до pH 3 и экстрагировали этилацетатом, промывали 10% раствором лимонной кислоты, водой, высушивали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Полученное масло хроматографировали на колонке с силикагелем (20×600 мм), уравновешенной бензолом, используя элюцию в градиенте бензол — этилацетат. Выход пептида (X) 1,5 г (53%).

11. *Woc-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Lys(Z)-OH (XI)*. 0,81 г (1,37 ммоль) соединения (X) растворяли в 7 мл абс.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , добавляли 0,64 мл (4,9 ммоль) эфирата трифторида бора. Смесь выдерживали 1 ч, добавляли 5 мл 10% раствора ацетата натрия и 15 мл насыщенного раствора хлористого натрия. Выделившееся масло экстрагировали этилацетатом, промывали водой, сушили над  $\text{MgSO}_4$  и упаривали. Трипептид кристаллизовали из смеси этилацетат — эфир. Получено 0,61 г (81%) ацетата (Xa).

К раствору 0,91 г (2,0 ммоль) соединения (Xa) в 10 мл абс. ТГФ прибавляли при охлаждении и перемешивании 0,22 мл (2,0 ммоль) *N*-метилморфолина и раствор 0,81 г (2,0 ммоль) *Woc-Thr(Bzl)-ONSu*. Через 2 дня ТГФ упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали 10% раствором лимонной кислоты, водой, высушивали и упаривали. Трипептид пе-

реосаждали из этилацетата петролейным эфиром, кристаллизовали из смеси этилацетат — эфир (2:1). Выход кристаллического трипептида (XI) 0,92 г (66%). Амнокислотный анализ: Thr 1,0 (1), Asp 1,0 (1), Lys 1,0 (1).

12. *Вос-Lys(Z)-Cys(MBzl)-OH* (XII), (XII-DL). 1,27 г (4,60 ммоль) хлоргидрата *S-n*-метоксибензилцистеина суспендировали в 10 мл воды. При охлаждении и перемешивании прибавляли 0,99 мл (0,9 ммоль) *N*-метилморфолина, затем приливали раствор 2,19 г (4,6 ммоль) сукцинимидного эфира *L*- или *D*-*Вос-Lys(Z)-ONSu* в 10 мл диоксана. Через 48 ч диоксан упаривали, добавляли этилацетат, раствор промывали 10% раствором лимонной кислоты, водой, высушивали  $MgSO_4$  и снова упаривали. Оставшееся масло хроматографировали на колонке (20×600 мм) с силикагелем, используя элюцию в градиенте растворителей бензол — этилацетат. Выход дипептидов (XII-LL) и (XII-DL) 2,0—2,2 г (75—79%).

13. *Вос-Asp(OBzl)-Lys(Z)-Cys(MBzl)-OH* (XIII) и (XIII-LDL). 1,75 г (2,90 ммоль) (XII) или (XII-DL) растворяли в 15 мл уксусной кислоты, добавляли 0,12 мл (8,9 ммоль) эфирата трехфтористого бора. Через 1 ч добавляли 10 мл воды, ацетатом натрия доводили pH до 7, дипептид осаждали насыщенным раствором хлористого натрия, вылавший осадок отфильтровывали, промывали водой. Выход дипептидов 1,34 г (80%).

К раствору 1,06 г (1,90 ммоль) (XIIa) или (XIIa-DL) в 10 мл ДМФА прибавляли при охлаждении и перемешивании 0,21 мл (1,90 ммоль) *N*-метилморфолина и 0,79 г (1,9 ммоль) *Вос-Asp(OBzl)-ONSu*. Через 1 сут ДМФА упаривали, добавляли этилацетат, полученный раствор промывали 10% раствором лимонной кислоты, водой, высушивали  $MgSO_4$  и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (20×500 мм), элюцию проводили в градиенте растворителей бензол — этилацетат. Выход трипептидов (XIII) или (XIII-LDL) 1,0 г (60%).

14. *Вос-Asp(OBzl)-Lys(Z)-Cys(MBzl)-OH* (XIII). 1,58 г (2,7 ммоль) соединения (X) растворяли в 10 мл ДМФА, добавляли 0,36 г (2,7 ммоль) НОВТ, охлаждали до  $-15^{\circ}C$  и прибавляли 0,60 г (2,91 ммоль) DCC, выдерживали 2 ч при  $0^{\circ}C$ . Затем добавляли 0,74 г (2,7 ммоль) хлоргидрата *S-n*-метоксибензилцистеина и 0,59 мл (5,4 ммоль) *N*-метилморфолина. Далее трипептид выделяли хроматографически, аналогично описанному выше. Выход трипептида (XIII) 1,50 г (70%).

15. *Вос-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-OH* (XIV). К раствору 3,0 г (13,0 ммоль) хлоргидрата бензилсерина в 15 мл воды при охлаждении добавляли 2,74 мл (25,0 ммоль) *N*-метилморфолина. Затем приливали раствор 5,70 г (13,0 ммоль) *Вос-Cys(MBzl)-ONSu* в 15 мл диоксана. Через 3 сут из реакционной смеси аналогично опыту 13 выделяли 6,0 г (89%) дипептида (XIV).

16. *Вос-Cys(MBzl)-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-OH* (XV). 3,0 г (5,79 ммоль) соединения (XIV) растворяли в 50 мл 25% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле, выдерживали 30 мин и упаривали. Остаток переосаждали из метанола эфиром. Выход трифторацетата пептида (XIVa) 2,30 г (74%). 3,0 г (5,64 ммоль) соединения (XIVa) растворяли в 25 мл диоксана, при охлаждении и перемешивании добавляли 1,24 г (11,20 ммоль) *N*-метилморфолина, затем приливали раствор 2,46 г (5,64 ммоль) *Вос-Cys(MBzl)-ONSu* в 10 мл диоксана. Через 2 сут растворитель упаривали, остаток экстрагировали этилацетатом, раствор промывали 10% раствором лимонной кислоты, водой, высушивали  $Na_2SO_4$  и упаривали. Продукт хроматографировали на колонке (30×600 мм) с силикагелем, используя элюирование в градиенте бензол — этилацетат. Выход трипептида (XV) 3,0 г (71%).

17. *Вос-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-OH* (XVI). 3,0 г (4,04 ммоль) соединения (XV) обрабатывали 25% трифторуксусной кислотой в хлористом метиле, как описано в предыдущем опыте для (XIVa). Получили 2,31 г (75%) трифторацетата (XVa). Из 3,0 г (4,0 ммоль) сое-

динения (XVa), 0,89 мл (8,4 ммоль) N-метилморфолина и 4,62 г (4,05 ммоль) Boc-Thr(Bzl)-ONSu в условиях опыта 16 получен тетрапептид (XVI). Его очистку осуществляли перекристаллизацией из смеси этилацетат — эфир. Выход 2,30 г (58%). Аминокислотный анализ: Thr 1,0 (1), Ser 1,0 (1), Cys 1,4 (2).

18. Boc-Val-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-OH (XVII). 2,0 г (2,13 ммоль) соединения (XVI) растворяли в 30 мл 25% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле, выдерживали 30 мин, упаривали, остаток промывали абс. эфиром, а затем пересаждали из метанола эфиром. Получено 1,51 г трифторацетата пептида (XVIIa) (74%). 1,70 г (1,78 ммоль) соединения (XVIIa) растворяли в 20 мл ДМФА, прибавляли при охлаждении 0,39 мл (3,60 ммоль) N-метилморфолина и 0,56 г (1,78 ммоль) Boc-Val-ONSu. Через 3 сут реакционную смесь подкисляли уксусной кислотой до pH ~5, растворитель упаривали, к остатку добавляли эфир, твердый осадок промывали эфиром и хроматографировали на колонке (15×300 мм) с силикагелем, элюируя пептид в градиенте растворителей хлороформ — диоксан. Получен 1,0 г (53%) пентапептида (XVII). Аминокислотный анализ: Val 1,0 (1), Thr 1,0 (1), Ser 0,9 (1), Cys 1,4 (2).

19. Boc-Glu(OBzl)-Val-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-OH (XVIII). 1,5 г (1,46 ммоль) соединения (XVII) растворяли в 30 мл смеси трифторуксусной кислоты и хлористого метилена (1 : 1), выдерживали 20 мин, упаривали, остаток растирали с эфиром. Пептид пересаждали из уксусной кислоты эфиром. Выход трифторацетата (XVIIIa) 1,30 г (86%).

1,31 г (1,25 ммоль) соединения (XVIIIa) растворяли в 10 мл ДМФА, добавляли при охлаждении 0,27 мл (2,50 ммоль) N-метилморфолина, затем приливали раствор 0,55 г (1,27 ммоль) Boc-Glu(OBzl)-ONSu в 5 мл диоксана. Смесь выдерживали 3 сут, подкисляли разбавленной уксусной кислотой, ДМФА упаривали, осаждали гексапептид смесью метанол — вода (1 : 1). Осадок отфильтровывали, промывали метанолом. Полученный продукт хроматографировали на колонке с амберлитом XE-89 в водном ДМФА. Выход гексапептида (XVIII) 0,60 г (44%). Аминокислотный анализ: Glu 1,0 (1), Val 1,0 (1), Thr 0,9 (1), Ser 0,9 (1), Cys 1,3 (2).

20. Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-OH (XIX). 1,12 г (0,91 ммоль) соединения (XVIII) растворяли в 2 мл смеси трифторуксусной кислоты и хлористого метилена (1 : 1). Далее пептид выделяли так же, как в предыдущем опыте. Выход трифторацетата (XIXa) 1,1 г (97%).

Из 1,40 г (0,89 ммоль) соединения (XVIIIa), 0,20 мл (1,80 ммоль) N-метилморфолина и 0,41 г (0,89 ммоль) Boc-Glu(OBzl)-ONSu в ДМФА получали аналогично пептиду (XVIII) гептапептид (XIX) с выходом 0,74 г (50%). Аминокислотный анализ: Glu 1,9 (2), Val 1,0 (1), Thr 0,9 (1), Ser 0,9 (1), Cys 1,3 (2).

21. Boc-Tyr(BzlCl<sub>2</sub>)-ONSu (XX). 4,40 г (10,0 ммоль) Boc-Tyr(BzlCl<sub>2</sub>)-OH растворяли в 15 мл абс. диоксана, при охлаждении добавляли 1,15 г (10,0 ммоль) N-оксисукцинимид и 2,06 г (10,0 ммоль) DCC, раствор перемешивали 4 ч на холоде и 2 ч при 20° С. Затем отфильтровывали диниклогексильсочевину, раствор упаривали, остаток растворяли в эфире, полученный раствор промывали 5% раствором NaHCO<sub>3</sub>, сушили над MgSO<sub>4</sub> и упаривали. Активированный эфир перекристаллизовывали из смеси эфира с петролейным эфиром. Выход эфира (XX) 4,2 г (78%).

22. Boc-Tyr(BzlCl<sub>2</sub>)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-OH (XXI). 1,0 г (0,68 ммоль) соединения (XIX) растворяли в 20 мл смеси трифторуксусной кислоты и хлористого метилена (1 : 1), выдерживали 30 мин, упаривали, остаток промывали эфиром. Выход трифторацетата гептапептида (XXIa) 0,9 г (75%).

а) Из 1,0 г (0,70 ммоль) соединения (XXIa), 0,14 мл (1,3 ммоль) N-метилморфолина и 0,38 г (0,70 ммоль) активированного эфира (XX) в условиях, приведенных выше для пептида (XVIII), получали 0,7 г (60%)

октапептида (XXI). Аминокислотный анализ: Tyr 0,5 (1), Glu 1,9 (2), Val 1,0 (1), Thr 0,9 (1), Ser 0,9 (1), Cys 1,3 (2).

б) 1,0 г (0,91 ммоль) соединения (XXIV) (см. ниже) и 0,12 г (0,91 ммоль) НОВТ растворяли в 7 мл ДМФА, охлаждали до  $-15^{\circ}\text{C}$  и добавляли 0,19 г (0,90 ммоль) DCC. Смесь перемешивали 1 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и затем прибавляли 0,91 г (1,0 ммоль) соединения (XVIa) и 0,24 мл (1,9 ммоль) N-метилморфолина. Реакционную смесь оставляли на 2 сут при  $20^{\circ}\text{C}$ , затем подкисляли уксусной кислотой, растворитель упаривали и осаждали октапептид метанолом. Осадок отфильтровывали и хроматографировали порциями по 0,5 г на колонке ( $20 \times 1000$  мм) с сефадексом LH-20 в ДМФА. Выход октапептида (XXI) 1,20 г (71%). Аминокислотный анализ: Tyr 0,6 (1), Glu 1,9 (2), Val 1,0 (1), Thr 1,0 (1), Ser 0,9 (1), Cys 1,4 (2).

23. *Вос-Glu(OBzl)-Val-OH (XXII)*. К раствору 1,0 г (8,5 ммоль) валлина и 0,93 мл (8,5 ммоль) N-метилморфолина в минимальном количестве воды приливали раствор 3,89 г (8,50 ммоль) *Вос-Glu(OBzl)-ONp* в 30 мл диоксиана. Реакционную смесь оставляли на 3 сут при  $20^{\circ}\text{C}$ , подкисляли лимонной кислотой до pH 3, упаривали диоксан и экстрагировали этилацетатом. Экстракт промывали 10% лимонной кислотой, водой, высушивали  $\text{MgSO}_4$  и упаривали. Оставшееся масло растворяли в минимальном количестве эфира и добавляли при охлаждении эквивалентное количество дидихлогексаминна. Выпавшую соль отфильтровывали и перекристаллизовывали из смеси метанола с эфиром. Получали 3 г ДЦГА-соли (56%). Соль разлагали 10% раствором лимонной кислоты. Выход дипептида (XXII) 1,67 г (45%).

24. *Вос-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-OH (XXIII)*. 1,60 г (3,67 ммоль) соединения (XXII) растворяли в 20 мл 25% раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле, выдерживали 30 мин, упаривали, остаток многократно промывали эфиром. Выход трифторацетата (XXIIIa) 1,4 г (85%). К раствору 1,33 г (3,0 ммоль) соединения (XXIIIa) и 0,67 мл (6,4 ммоль) N-метилморфолина в 10 мл ДМФА прибавляли 1,37 г (3,0 ммоль) *Вос-Glu(OBzl)-ONp*. Реакционную смесь оставляли на 4 сут при  $20^{\circ}\text{C}$ , затем подкисляли лимонной кислотой, упаривали ДМФА, растворяли остаток в этилацетате, раствор промывали 10% лимонной кислотой, водой, высушивали  $\text{MgSO}_4$  и упаривали. Продукт, полученный в виде масла, хроматографировали на колонке ( $30 \times 600$  мм) с силикагелем в градиенте растворителей бензол — этилацетат — метанол, 2 : 0,5). Выход трипептида (XXIII) 1,21 г (57%). Аминокислотный анализ: Glu 1,9 (2), Val 1,0 (1).

25. *Вос-Tyr(BzlCl<sub>2</sub>)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-OH (XXIV)*. 1,51 г (2,20 ммоль) соединения (XXIII) обрабатывали 24 мл 25% трифторуксусной кислоты в хлористом метиле аналогично предыдущему опыту. Выход трифторацетата (XXIIIa) 1,32 г (85%).

К раствору 1,19 г (1,70 ммоль) соединения (XXIIIa) и 0,37 мл (3,40 ммоль) N-метилморфолина в ДМФА добавляли 0,91 г (1,70 ммоль) *Вос-Tyr(Bzl(Cl<sub>2</sub>))ONSu*. Через 3 сут раствор подкисляли лимонной кислотой, ДМФА упаривали, растворяли остаток в этилацетате, раствор промывали водой, высушивали  $\text{MgSO}_4$  и упаривали. Очистку полученного продукта (XXI) проводили на колонке ( $15 \times 600$  мм) с силикагелем, используя элюент в градиенте растворителей хлороформ — метанол. Выход тетрапептида (XXIV) 1,30 г (65%). Аминокислотный анализ: Tyr 0,6 (1), Glu 1,9 (2), Val 1,0 (1).

26. *Вос-Tyr(BzlCl<sub>2</sub>)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Lys(Z)-OH (XXV)*. 0,21 г (0,30 ммоль) трипептида (XI) растворяли в 2 мл  $\text{C}_2\text{H}_5\text{COONH}_4$  и прибавляли 0,12 мл (0,9 ммоль) эфира трифторида бора. Далее после обработки, аналогичной проведенной в опыте 11 для соединения (Xa), получали 0,2 г (91%) ацетата (XIa).

0,45 г (0,25 ммоль) соединения (XXI), 0,03 г (0,25 ммоль) НОВТ растворяли в 5 мл ДМФА, охлаждали до  $-15^{\circ}\text{C}$  и добавляли 0,05 г (0,2×5 ммоль) ДСС. Реакционную смесь выдерживали 2 ч при  $0^{\circ}\text{C}$ , затем добавляли 0,17 г (0,25 ммоль) соединения (XIa) и 0,05 мл (0,5 ммоль) N-метилморфолина. Через 2 сут реакцию смесь подкисляли уксусной кислотой, ундекапептид осаждали метанолом. Осадок отфильтровывали, промывали метанолом, смесью метанола и диоксана. Полученное вещество хроматографировали на колонке (30×1200 мм) с сефадексом LH-20 в ДМФА. Выход ундекапептида (XXV) 0,36 г (58%). Аминокислотный анализ: Tyr 0,5 (1), Glu 1,8 (2), Val 1,0 (1), Thr 1,5 (2), Ser 0,7 (1), Asp 0,9 (1), Lys 1,0 (1), Cys 1,2 (2).

27. *Boc-Cys(MBzl)-Asn(Bzh)-His-Pro-Pro-Lys(Z)-Arg(Tos)-Gln(Bzh)-Pro-Gly-OBzl* (XXVI). 0,51 г (0,44 ммоль) соединения (VI) растворяли в  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , добавляли 0,19 г (1,50 ммоль) меркаптоэтансульфокислоты, выдерживали 1 ч, а затем пентапептид осаждали водой. Осадок отфильтровывали, промывали водой. Получали 0,4 г (93%) соединения (VIa).

0,41 г (0,40 ммоль) пептида (IX) и 0,42 г (0,40 ммоль) соединения (VIa) растворяли в 10 мл ДМФА, добавляли 0,05 г (0,4 ммоль) НОВТ, охлаждали до  $-15^{\circ}\text{C}$ , приливали 0,044 мл (0,40 ммоль) N-метилморфолина и 0,08 г (0,40 ммоль) ДСС. Реакционную массу выдерживали 2 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и 2 сут при  $20^{\circ}\text{C}$ . Декапептид (XXIV) осаждали смесью этилацетат — эфир. Полученное вещество отфильтровывали и подвергали очистке на колонке (20×1000 мм) с сефадексом LH-20 в метаноле. Выход декапептида (XXVI) 0,50 г (63%). Аминокислотный анализ: Asp 0,8 (1), His 1,0 (1), Pro 2,8 (3), Lys 0,9 (1), Arg 0,8 (1), Glu 0,9 (1), Gly 0,9 (1), Cys 0,6 (1).

28. *Boc-Tyr(BzCl<sub>2</sub>)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Lys(Z)-Cys(MBzl)-Asn(Bzh)-His-Pro-Pro-Lys(Z)-Arg(Tos)-Gln(Bzh)-Pro-Gly-OBzl* (XXVII). 1,3 г (0,6 ммоль) соединения (XXVI) растворяли в 26 мл смеси трифторуксусной кислоты и хлористого метилена (1:1), выдерживали 30 мин и упаривали. Остаток многократно промывали эфиром. Выход трифторацетата декапептида (XXVIIa) 1,3 г (94%).

1,3 г (0,64 ммоль) соединения (XXVIIa) и 1,53 г (0,62 ммоль) ундекапептида (XXV) растворяли в 10 мл ДМФА и добавляли 0,08 г (0,62 ммоль) НОВТ, охлаждали до  $-15^{\circ}\text{C}$ , приливали 0,07 мл (0,62 ммоль) N-метилморфолина и 0,13 г (0,62 ммоль) ДСС, выдерживали 2 ч при  $0^{\circ}\text{C}$  и 2 сут при  $20^{\circ}\text{C}$ . Отфильтровывали динилгоксимочевину, осаждали пептид метанолом. Осадок отфильтровывали и хроматографировали порциями на колонке с сефадексом LH-20 в ДМФА. Выход гетейкозапептида (XXVII) 1,38 г (51%). Аминокислотный анализ: Tyr 0,5 (1), Glu 2,8 (3), Val 1,0 (1), Thr 2,4 (3), Ser 0,8 (1), Asp 1,9 (2), Lys 2,1 (2), His 1,0 (1), Pro 2,8 (3), Gly 0,9 (1), Cys 1,9 (3).

29. *Boc-Lys(Z)-Pro-OH* (XXVIII). 9,54 г (20 ммоль) Boc-Lys(Z)-ONSu и 2,32 г (20 ммоль) пролина растворяли в 10 мл пиридина и добавляли 2,42 мл (20,0 ммоль) N-этизморфолина. Перемешивали 3 сут при  $20^{\circ}\text{C}$ , затем выливали в воду со льдом, экстрагировали этилацетатом, экстракты промывали 10% раствором лимонной кислоты, водой, высушивали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (30×600 мм) с силикагелем, используя элюцию в градиенте растворителей бензол — этилацетат. Выход дипептида (XXVIII) 3,75 г (39%).

30. *Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-OH* (XXIX). 3,67 г (7,70 ммоль) дипептида (XXVIII) растворяли в 15 мл уксусной кислоты и добавляли 2,84 мл (20 ммоль) эфирата трехфтористого бора. Реакционную смесь выдерживали 30 мин, упаривали, остаток промывали сухим эфиром. Полученные 3,27 г (7,50 ммоль) ацетата дипептида (XXIXa) и 3,58 г (7,50 ммоль) Boc-Lys(Z)-ONSu растворяли в 20 мл диоксана, добавляли при охлаждении 1,80 мл (15,4 ммоль) N-этилморфолина. Через 3 сут растворитель

упаривали, подкисляли насыщенным раствором лимонной кислоты, масло экстрагировали этилацетатом, промывали 10% раствором лимонной кислоты, водой, высушивали  $MgSO_4$ , упаривали, остаток хроматографировали на колонке (30×600 мм) с силикагелем, используя элюцию в градиенте растворителей бензол — этилацетат. Выход трипептида (XXIX) 4,38 г (73%). Аминокислотный анализ: Lys 2,0 (2), Pro 1,0 (1).

31. *Boc-Ser(Bzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-OH* (XXX). 4,51 г (6,10 ммоль) трипептида (XXIX) растворяли в 15 мл  $CH_3COOH$  и добавляли 21,72 мл (15,30 ммоль) эфирата трехфтористого бора. Реакционную смесь выдерживали 30 мин, упаривали, остаток промывали абсолютным эфиром. Полученные 4,01 г (5,42 ммоль) ацетата трипептида (XXIXa) растворяли в 20 мл диоксана, добавляли при охлаждении 2,12 г (5,40 ммоль) *Boc-Ser(Bzl)-ONSu* в 10 мл диоксана и 1,30 мл (10,81 ммоль) *N*-этилморфолина. Через 3 сут диоксан упаривали, остаток экстрагировали этилацетатом, промывали 10% раствором лимонной кислоты, водой, высушивали  $MgSO_4$  и упаривали. Оставшееся масло хроматографировали на колонке (30×800 мм) с силикагелем, элюируя в градиенте растворителей хлороформ — (этилацетат — метанол, 2 : 1). Выход тетрапептида (XXX) 4,02 г (74%). Аминокислотный анализ: Lys 2,0 (2), Pro 1,0 (1), Ser 0,9 (1).

32. *Boc-Cys(MBzl)-Pro-OH* (XXXI). 13,14 г (30,0 ммоль) *Boc-Cys(MBzl)-ONSu* и 46,0 г (40,0 ммоль) пролина растворяли в 25 мл 50% водного диоксана, добавляли 3,36 г (40,0 ммоль)  $NaHCO_3$ . Реакционную смесь перемешивали 3 сут при 20° С, диоксан упаривали, остаток подкисляли при охлаждении лимонной кислотой и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный раствор промывали 10% раствором лимонной кислоты, водой, высушивали  $MgSO_4$ , упаривали. Полученное масло хроматографировали на колонке (30×800 мм) с силикагелем, используя градиентную элюцию системой растворителей хлороформ — (этилацетат — метанол, 2 : 0,5). Выход дипептида (XXXI) 5,91 г (45%).

Пептид (XXXI) в виде масла растворяли в 100 мл абс. эфира и добавляли 2,50 г ДСНА. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром. Выход дидицлогексиламмонийной соли дипептида (XXXI) 7,91 г (43%).

33. *Boc-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Pro-OH* (XXXII). 5,53 г (13,0 ммоль) дипептида (XXXI) растворяли в 20 мл 2 н. раствора  $HCl$  в диоксане. Выдерживали 20 мин, упаривали, остаток переосаждали из метанола эфиром. Выход хлоргидрата дипептида (XXXIIa) 4,15 г (92%).

К смеси 3,8 г (10 ммоль) дипептида (XXXIIa) и 3,3 г (8,1 ммоль) *Boc-Thr(Bzl)-ONSu* в 20 мл диоксана добавляли 2,4 мл (20 ммоль) *N*-этилморфолина и перемешивали 3 сут. Далее пептид выделяли аналогично пептиду (XXXI). Выход пептида (XXXII) 3,23 г (58%). Аминокислотный анализ: Thr 1,0 (1), Pro 1,0 (1), Cys 0,7 (1).

34. *Boc-Ala-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Pro-OH* (XXXIII). Из 3,21 г (5,10 ммоль) пептида (XXXII) обработкой 25%  $CF_3COOH$  в хлористом метиле не получали трифторацетат трипептида (XXXIIIa) с выходом 3,09 г (94%). Тетрапептид (XXXIII) получали из 3,0 г (5,0 ммоль) пептида (XXXIIa), 1,43 г (5,0 ммоль) *Boc-Ala-ONSu* и 1,24 мл (10,0 ммоль) *N*-этилморфолина в условиях, описанных для пептида (XXXI). После хроматографирования на колонке (20×500 мм) с силикагелем в системе хлороформ — (этилацетат — метанол, 3 : 1) получено 1,64 г (53%) пептида (XXXIII). Аминокислотный анализ: Ala 1,0 (1), Thr 0,9 (1), Pro 1,0 (1), Cys 0,7 (1).

35. *Boc-Ala-Ala-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Pro-OH* (XXXIV). 1,60 г (2,31 ммоль) пептида (XXXIII) обрабатывали 10 мл 25%  $CF_3COOH$  в хлористом метиле. Получали 1,50 г (94%) трифторацетата (XXXIVa), 1,29 г (2,10 ммоль) соединения (XXXIVa) и 0,60 г (2,10 ммоль) *Boc-Ala-ONSu* растворяли в 7 мл пиридина, добавляли 0,49 мл (4,20 ммоль) *N*-этилморфолина и перемешивали 3 сут при 20° С. Пиридин упаривали,



остаток растворяли в этилацетате, промывали 10% раствором лимонной кислоты, водой, сушили и упаривали. Очистка была аналогична вышеприведенной для пептида (XXXIII). Получали 1,0 г (63%) пептида (XXXIV). Аминокислотный анализ: Ala 1,9 (2), Thr 0,9 (1), Pro 1,0 (1), Cys 0,7 (1).

36. *Woc-Cys(MBzl)-Ala-Ala-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Pro-OH* (XXXV). Обработкой 1,0 г (1,1 ммоль) пептида (XXXIV) 50%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  в хлористом метиле не получен трифторацетат (XXXIVa) с выходом 0,89 г (95%).

0,88 г (1,0 ммоль) пептида (XXXIVa) растворяли в 10 мл диоксана, добавляли 0,47 г (1,0 ммоль) *Woc-Cys(MBzl)-ONSu* в 5 мл диоксана и 0,25 мл (2,10 ммоль) *N*-этилморфолина. Перемешивали 3 сут при 20°С, подкисляли реакционную смесь уксусной кислотой, упаривали, к остатку добавляли эфир. Осадок отфильтровывали и хроматографировали на колонке (25×500 мм) в системе хлороформ — этилацетат — метанол. Выход гексапептида (XXXV) 0,84 г (50%). Аминокислотный анализ: Ala 1,9 (2), Thr 0,9 (1), Pro 1,0 (1), Cys 1,3 (2).

37. *Woc-Cys(MBzl)-Ala-Ala-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Pro-Ser(Bzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-OH* (XXXVI). 0,92 г (1,0 ммоль) пептида (XXX) растворяли в 4 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , добавляли 0,35 мл (2,50 ммоль) эфирата трехфтористого бора, выдерживали 30 мин и в условиях опыта 31 получали 0,83 мг (95%) ацетата (XXXa).

0,49 г (0,50 ммоль) соединения (XXXV) и 0,67 г (0,50 ммоль) НОВТ растворяли в смеси 20 мл ТГФ и 1 мл ДМФА, охлаждали до -15°С и при перемешивании добавляли 0,10 г (0,50 ммоль) ДСС. Перемешивали 2 ч при 0°С и добавляли 0,44 г (0,50 ммоль) пептида (XXXa) в 3 мл ТГФ и 0,12 мл (1,0 ммоль) *N*-этилморфолина. Перемешивали 24 ч при 20°С. Упаривали растворитель до 1/3 объема, к остатку при охлаждении добавляли 0,5 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , затем осаждали декапептид эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, сушили. Очистку декапептида (XXXVI) проводили гель-фильтрацией на колонке (30×1000 мм) с сефадексом LH-20 в ДМФА. Выход декапептида (XXXVI) 0,51 г (60%). Аминокислотный анализ: Thr 0,9 (1), Ser 0,9 (1), Pro 2,0 (2), Ala 1,9 (2), Lys 1,9 (2), Cys 1,3 (2).

38. *Woc-Leu-Gly-OH* (XXXVII). К суспензии 7,50 г (10,0 ммоль) глицина в 10 мл воды добавляли насыщенный раствор  $\text{NaHCO}_3$  до pH 8, к полученному раствору при охлаждении добавили раствор 30,7 г (9,20 ммоль) *Woc-Leu-ONSu* в 60 мл диоксана. Полученную смесь перемешивали 1,5 ч при 0-5°С и 2 сут при 20°С. Затем диоксан упаривали, добавляли 10% лимонную кислоту до pH 5 и экстрагировали этилацетатом. Раствор промывали 10% лимонной кислотой, водой, высушивали и упаривали. Перекристаллизовывали из смеси этилацетат — эфир (1:1), получали 20,31 г (76,6%) дипептида (XXXVII).

39. *Woc-Glu(OBzl)-Leu-Gly-OH* (XXXVIII). 7,24 г (24,0 ммоль) трифторацетата (XXXVIIa), полученного обработкой 7,49 г (26,0 ммоль) соединения (XXXVII) 50%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  в хлористом метиле, растворяли в 30 мл смеси ДМФА — ТГФ (5:1) и прибавляли 11,45 г (26,0 ммоль) *Woc-Glu(OBzl)-ONp* и 6,92 мл (48,0 ммоль)  $\text{Et}_3\text{N}$ . Через 3 сут реакционную смесь подкисляли, растворитель упаривали, остаток промывали смесью эфир — петролейный эфир и перекристаллизовывали из смеси эфир — диизопропиловый эфир (1:1). Выход трипептида (XXXVIII) 6,64 г (54,6%). Аминокислотный анализ: Glu 1,0 (1), Leu 1,0 (1), Gly 1,0 (1).

40. *Woc-Val-Glu(OBzl)-Leu-Gly-OH* (XXXIX). 6,50 г (12,0 ммоль) соединения (XXXVIIIa), полученного обработкой пептида (XXXVIII) эфиром трехфтористого бора, аналогично обработке, описанной в опыте 31, растворяли в 20 мл ДМФА, охлаждали до -5°С, прибавляли 3,36 мл (24,0 ммоль)  $\text{Et}_3\text{N}$  и 3,77 г (12,0 ммоль) *Woc-Val-ONSu*. Через 20 ч добавляли 2 мл уксусной кислоты, ДМФА упаривали, остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетат — гептап. Выход тетрапептида (XXXIX) 6,29 г (77%). Аминокислотный анализ: Val 1,0 (1), Glu 1,0 (1), Leu 1,0 (1), Gly 1,0 (1).



41. *Boc-Val-Val-Glu(OBzl)-Leu-Gly-OH (XL)*. 6,39 г (9,26 ммоль) соединения (XXXIXa), полученного из пептида (XXXIX) обработкой 25%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  в хлористом метиле, растворяли в 20 мл ДМФА, охлаждали до  $-5^\circ\text{C}$ , прибавляли 2,58 мл (18,40 ммоль)  $\text{Et}_3\text{N}$  и 2,89 г (9,4 ммоль)  $\text{Boc-Val-ONSu}$ . Далее пептид выделяли так же, как описано для пептида (XXXIX) в предыдущем опыте. Выход пептида (XL) 5,20 г (70%). Аминокислотный анализ: Val 1,9 (2), Glu 1,0 (1), Leu 1,0 (1), Gly 1,0 (1), 72-часовой гидролиз.

42. *Boc-Lys(Z)-Val-Val-Glu(OBzl)-Leu-Gly-OH (XLI)*. 3,46 г (3,8 ммоль) соединения (XLa), полученного обработкой пептида (XL) 25% раствором  $\text{CF}_3\text{COOH}$  в хлористом метиле, растворяли в смеси диоксан — ДМФА (9:1), при охлаждении добавляли 8,34 мл (7,6 ммоль)  $N$ -метилморфолина и 1,96 г (4,10 ммоль)  $\text{Boc-Lys(Z)-ONSu}$ . Через 2 сут реакционную смесь подкисляли  $\text{CH}_3\text{COOH}$  до pH 4–5, растворитель упаривали, к остатку добавляли эфир, отфильтровывали, пересаждали из этилацетата гешаном и хроматографировали на колонке с катионитом Amberlite XE-89 в водном диоксане. Выход пептида (XLI) 2,0 г (50%). Аминокислотный анализ: Lys 1,0 (1), Val 1,9 (2), Glu 1,0 (1), Leu 1,0 (1), Gly 1,0 (1), 72-часовой гидролиз.

43. *Boc-Lys(Z)-Val-Val-Glu(OBzl)-Leu-Gly-Cys(MBzl)-Ala-Ala-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Pro-Ser(Bzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-OH (XLII)*. 0,61 г (0,34 ммоль) пептида (XXXVI) растворяли в 3 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , обрабатывали 0,14 мл (1,06 ммоль) эфирата трехфтористого бора так же, как в опыте 31. Получали 0,52 г (89%) ацетата (XXXVIa).

0,44 г (0,44 ммоль) соединения (XLI) и 0,06 г (0,44 ммоль) НОВТ растворяли в 5 мл ДМФА при  $-15^\circ\text{C}$ , добавляли 0,09 г (0,44 ммоль) ДСС, выдерживали 2 ч при  $0^\circ\text{C}$ , а затем прибавляли 0,50 г (0,31 ммоль) соединения (XXXVIa) и 0,09 мл (0,8 ммоль)  $N$ -метилморфолина. Через 2 сут отфильтровывали выпавшую дициклогексилмочевину, фильтрат подкисляли  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и осаждали гексадекапептид метанолом. Осадок отфильтровывали, промывали метанолом и подвергали очистке на колонке (12×500 мм) с сефадексом LH-20 в ДМФА. Выход гексадекапептида (XLII) 0,50 г (57%). Аминокислотный анализ: Lys 2,7 (3), Val 1,4 (2), Glu 1,0 (1), Leu 1,0 (1), Gly 1,0 (1), Ala 2,0 (2), Thr 0,9 (1), Pro 1,9 (2), Ser 0,9 (1), Cys 1,4 (2).

44. *Boc-Cys(MBzl)-Ala-Ala-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Pro-Ser(Bzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-Tyr(BzlCl<sub>2</sub>)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Lys(Z)-Cys(MBzl)-Asn(Bzh)-His-Pro-Pro-Lys(Z)-Arg(Tos)-Gln(Bzh)-Pro-Gly-OBzl (XLIII)*. 0,053 г (0,012 ммоль) геейкозапептида (XXVII) обрабатывали 1 мл 25% трифторуксусной кислоты в хлористом метиле, через 30 мин упаривали, остаток промывали абе. эфиром. Выход трифторацетата геейкозапептида (XXVIIa) 0,048 г (91%).

К 0,044 г (0,010 ммоль) трифторацетата геейкозапептида (XXVIIa) и 0,018 г (0,010 ммоль) декапептида (XXXVI) в 2 мл ДМФА добавляли 0,0015 г (0,01 ммоль) НОВТ. Охлаждали до  $-15^\circ\text{C}$  и приливали 0,0011 мл (0,01 ммоль)  $N$ -метилморфолина и 0,0024 г (0,01 ммоль) ДСС. Выдерживали 2 ч при  $0^\circ\text{C}$  и 3 сут при  $20^\circ\text{C}$ . Затем пептид осаждали метанолом. Осадок отфильтровывали, промывали метанолом, диоксаном и полученный продукт хроматографировали на колонке с сефадексом LH-20 аналогично предыдущему опыту. Выход пептида (XLIII) 0,036 г (59%). Аминокислотный анализ: Ala 2,0 (2), Thr 2,4 (3), Pro 4,3 (5), Ser 1,7 (2), Lys 3,4 (4), Tyr 0,6 (1), Asp 1,9 (2), His 0,9 (1), Arg 0,8 (1), Cys 3,4 (5), Glu 2,8 (3), Val 1,0 (1), Gly 1,0 (1).

45. *Boc-Lys(Z)-Val-Val-Glu(OBzl)-Leu-Gly-Cys(MBzl)-Ala-Ala-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Pro-Ser(Bzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Val-Thr(Bzl)-Cys(MBzl)-Cys(MBzl)-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Lys(Z)-Cys(MBzl)-Asn(Bzh)-His-Pro-Lys(Z)-Arg(Tos)-Gln(Bzh)-*

*Pro-Gly-OBzl (XLIV)*. Из 0,44 г (0,010 ммоль) трифторацетата гениейкозапептида (XXVIIa) и 0,029 г (0,010 ммоль) гексадекапептида (XLII) в условиях предыдущего опыта получали гептатриаконтапептид (XLIV) с выходом 0,044 г (62%). Гель-фильтрацию проводили на колонке (12×760 мм) со смолой Bio-Beads S-XI в ДМФА. Аминокислотный анализ: Lys 4,6 (5), Val 2,3 (3), Glu 3,6 (4), Leu 0,9 (1), Gly 1,8 (2), Ala 2,0 (2), Thr 2,3 (3), Pro 4,2 (5), Ser 1,8 (2), Tyr 0,5 (1), Cys 3,3 (5), Arg 0,9 (1), Asp 1,9 (2), His 0,9 (1).

Авторы выражают свою признательность М. Б. Сапоровской и С. Б. Витту за проведение ГЖХ-изменений степени рацемизации ряда аминокислот, С. Л. Портновой — за снятие  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров, Н. А. Алдаповой, Н. М. Арзамазовой, Н. А. Потапенко — за помощь в проведении анализа N-концевых групп.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Tsetlin V. I., Mikhaleva I. I., Myagkova M. A., Senyavina L. B., Arseniev A. S., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1975) in: Peptides: Chemistry, Structure and Biology (Walter R., Meinhofer J., eds), pp. 935–941, Ann Arbor Science, Publ.
2. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Adamovich T. B., Zhdanova L. N., Soldatov N. M., Ovchinnikov Yu. A. (1976) Abstracts of USSR-FRG Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins, p. 19, Dushanbe.
3. Ivanov V. T. (1975) *Toxicol.*, **13**, 100–101.
4. Ivanov V. T., Mikhaleva I. I., Volpina O. M., Myagkova M. A., Deigin V. I. (1976) in: Peptides 1976 (Loffet A., ed.), pp. 219–231, Brussels.
5. Mikhaleva I. I., Myagkova M. A., Volpina O. M., Ivanov V. T. (1976) 4th Indo-Soviet Symposium on Chemistry of Natural Products Including Pharmacology, Abstracts, Lucknow, India, p. 105.
6. Ivanov V. T., Mikhaleva I. I., Myagkova M. A., Volpina O. M., Deigin B. I. (1976) Abstracts of USSR-FRG Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins, pp. 8–9, Dushanbe.
7. Михалева И. И., Мягкова М. А., Вольпина О. М., Иванов В. Т. (1977) Тез. IV Всес. симпозиума по химии белков и пептидов, с. 55, Минск.
8. Mikhaleva I. I., Deigin V. I., Volpina O. M., Ulyashin V. V., Nuritdinov A. R., Tsetlin V. I., Ivanov V. T. (1978) Proceedings of the Second FRG-USSR Symposium on Chemistry of Peptide and Proteins, pp. 6–8, Munich.
9. Lee C. Y. (1970) *Clin. Toxicol.*, **3**, 457.
10. Mebs D., Narita K., Iwanaga S., Samejima Y., Lee C. Y. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **44**, 711–716.
11. Mebs D., Narita K., Iwanaga S., Samejima Y., Lee C. Y. (1972) *Z. Physiol. Chem.*, **353**, 243–262.
12. Beyermann H. C., De Leer W. B., Floor J. (1973) *Recueil*, **92**, 481–492.
13. König W., Geiger R. (1970) *Chem. Ber.*, **103**, 788–798.
14. Шредер Е., Любке К. (1967) Пептиды, с. 147, «Мир», М.
15. Fujii T., Sakakibara S. (1974) *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **47**, 3146–3151.
16. Rink H., Riniker B. (1974) *Helv. chim. acta*, **57**, 831–835.
17. Сапоровская М. Б., Пасхонина Е. А., Никитина С. Б., Витт С. В., Беликов В. М. (1974) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **676**–682.
18. Витт С. В., Мягкова М. А., Сапоровская М. Б., Никитина С. Б., Беликов В. М. (1978) *Биоорганик. химия*, **4**, 154–157.
19. Feinberg R. S., Merrifield R. B. (1975) *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 3485–3496.
20. Fletcher G. A., Jones J. H. (1972) *Inter. J. Peptide Protein Res.*, **4**, 347–371.
21. Fletcher G. A., Jones J. H. (1975) *Inter. J. Peptide Protein Res.*, **7**, 94–102.
22. Steward J. M., Young J. D. (1969) in: *Solid Phase Peptide Synthesis*, pp. 31–32, W. H. Freeman and Company, San Francisco.

Поступила в редакцию  
26.XII.1979

#### SYNTHETIC STUDY OF $\alpha$ -BUNGAROTOXIN. I. SYNTHESIS OF THE PROTECTED HEPTATRIACONTAPEPTIDE HAVING AMINO ACID SEQUENCE 38-74 OF $\alpha$ -BUNGAROTOXIN

MIKHALEVA I. I., MYAGKOVA M. A., ZHUKOVA Z. F., IVANOV V. T.  
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the U.S.S.R., Moscow

The protected heptatriacontapeptide has been synthesized which corresponds to the amino acid sequence 38-74 of  $\alpha$ -bungarotoxin, a postsynaptically acting neurotoxin. The synthesis was accomplished by condensation of the fragments prepared by stepwise elongation of the peptide chain.  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and gas liquid chromatography on an asymmetric phase were used for assessing the racemization degree when optically active amino acid residues were activated during the fragment coupling steps.