



УДК 547.962.07+591.145:2

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ АПАМИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
РАДИОАКТИВНОЙ АЦЕТАМИДОМЕТИЛЬНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ*Нуриддинов А. Р., Оханов В. В., Цетлин В. И.,
Иванов В. Т.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Твердофазным методом на бензгидриламиновой смоле осуществлен синтез апамина, нейротоксического компонента яда пчел. При введении остатков Cys¹ и Cys³ использовали *трет*-бутилоксикарбонил-S-([³H]ацетамидометил)цистеин, что упростило детектирование [³H]Асм-апамина при хроматографической очистке и контроль за полнотой последующего удаления [³H]Асм-групп. После окисления сульфгидрильных групп и хроматографической очистки получен пептид, идентичный апамину по хроматографическим свойствам, токсичности и кривым КД, а также данным ¹H-ЯМР высокого разрешения.

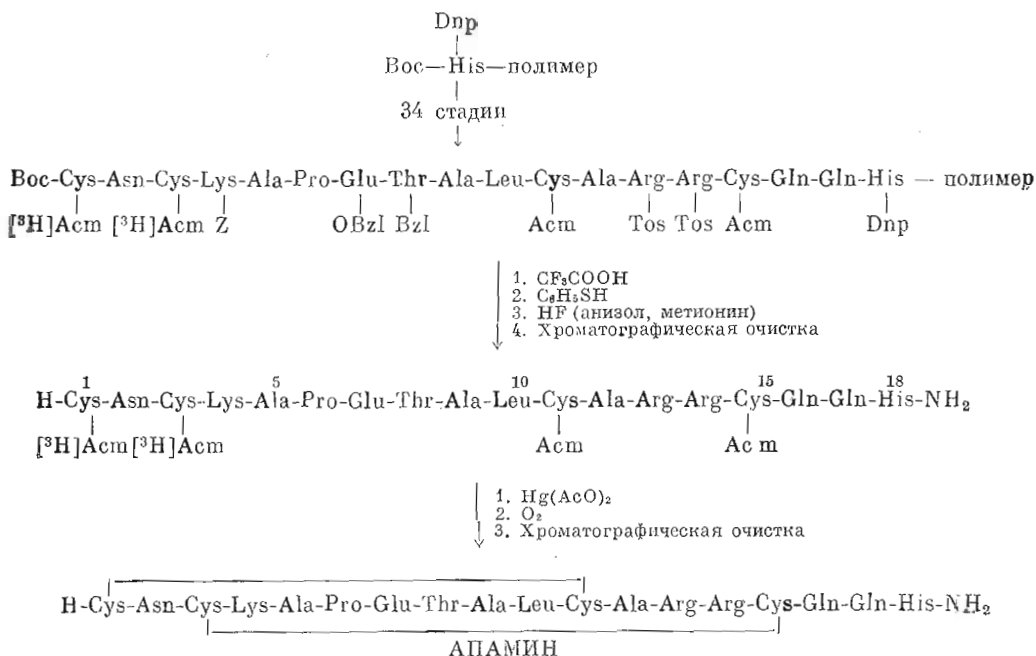
Апамин, содержащийся в яде пчел, является нейротоксическим пептидом, действующим на центральную нервную систему (см. [1–3] и приведенные там ссылки). Для исследования зависимости между структурой и биологической активностью за период с 1975 по 1979 г. было осуществлено несколько синтезов апамина и его аналогов [4–11], главным образом с помощью твердофазного метода. В описанном нами синтезе апамина [5, 8] заключительные стадии (удаление защитных групп с полностью защищенного октадекапептида и окислительное замыкание дисульфидных связей) протекали с низким выходом — 1%. Как показано опытами с восстановленным природным апамином [12], столь низкий выход в значительной мере объясняется протеканием побочных реакций с участием SH-групп при обработке защищенного пептида жидким фтористым водородом. Частично эти побочные реакции удалось подавить добавками тиолов, однако для получения более высоких выходов стала очевидной необходимость использования SH-защитных групп, устойчивых к действию фтористого водорода, или поиск схем синтеза, исключая его применение.

В настоящем сообщении описывается твердофазный синтез апамина, в котором для защиты SH-групп цистеина использована ацетамидометильная группа, устойчивая к действию фтористого водорода и удаляемая при обработке солями ртути или иодом [13, 14]. Асм-группа была успешно использована в твердофазных синтезах апамина и его аналогов, сообщения о которых [6, 9, 11] опубликованы во время выполнения настоящей работы. Нами была впервые получена и использована радиоактивная [³H]ацетамидометильная группировка, что облегчало обнаружение

В работе приняты стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC—IUB; кроме того, использованы следующие сокращения: Асм — ацетамидометил, Днр — динитрофенил.

промежуточного пептида при хроматографической очистке, а также позволило проконтролировать полноту удаления этой группировки.

Для защиты α -аминогрупп использовали *tert*-бутилоксикарбонильную группу, ϵ -аминогруппа лизина защищалась бензилоксикарбонильным остатком. Гуанидиногруппа аргинина блокировалась тозилльной группой, а имидазольный остаток гистидина — динитрофенильной группой. В отличие от предыдущего синтеза апамина [5, 8] ω -амидные группы глутамина и аспарагина не защищали; при этом учитывались результаты работ [4, 6, 7, 10], показавших применимость такой схемы при работе с бензгидриламиновой смолой. Гидроксильную функцию треонина и γ -карбоксил глутаминовой кислоты защищали бензильными группами.



Синтез (см. схему) проводили карбодимидным методом на автоматическом синтезаторе пептидов фирмы Beckman (США), используя бензгидриламиновую смолу фирмы Pierce (США) (0,4 ммоль аминогрупп на 1 г смолы). Присоединение Woc-His(Dnp)-ОН к полимеру проводили дважды, используя эквимольное соотношение производного и аминогрупп полимера. В результате количество присоединенного гистидина составило 0,2 ммоль/г смолы. Последовательное наращивание пептидной цепи проводили по стандартной программе (см. «Экспериментальную часть»). Конденсация, как правило, проводилась дважды, и полнота реакции проверялась нингидриновым методом. При присоединении остатков Gln¹⁷, Cys¹⁴, Leu¹⁰, Asn² конденсацию проводили 3 раза, так как после двух конденсаций реакция с нингидрином была положительной (в работах [9, 10] также отмечались трудности присоединения аминокислот Gln¹⁷, Cys¹⁴, Leu¹⁰, Thr⁸, Ala⁵, Asn²). Свободные аминогруппы, обнаруживаемые после трех конденсаций на стадиях присоединения Leu¹⁰ и Cys¹⁴, а также после второй посадки His¹⁸, блокировали реакцией с ацетилимидазолом в условиях работы [15]. Для присоединения остатков Cys⁴ и Cys³ использовали Woc-Cys [³H]AcM, полученный исходя из меченого укусного ангидрида.

После завершения синтеза пептидполимер обрабатывали 30% раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле для удаления Woc-группы с N-концевого цистеина, а затем тиофенолом [7] для удаления Dnp-группы с остатка гистидина. Затем для отщепления пептида от

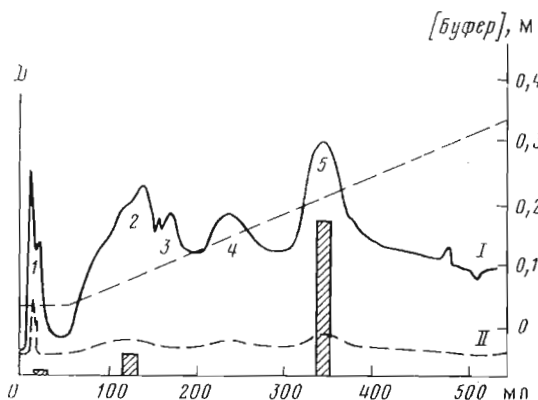


Рис. 1

Рис. 1. Хроматография неочищенного $[^3\text{H}]$ Асп-апамина (после обессоливания на сефадексе G-10) на колонке (2×6 см) с СМ-целлюлозой СМ-52 в линейном градиенте аммонийацетатного буфера 0,03 М (250 мл) — 0,33 М (250 мл), рН 5,5. Прямоугольниками обозначена относительная радиоактивность фракций. Фракция 5 отвечает $[^3\text{H}]$ Асп-апамину. Поглощение при 206 нм (I), при 280 нм (II)

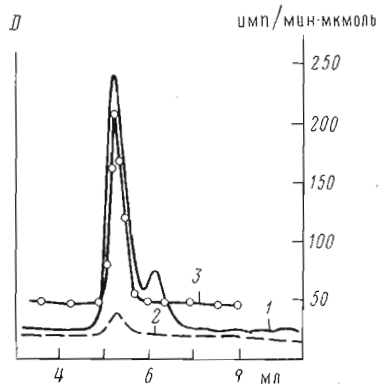


Рис. 2

Рис. 2. Хроматография 2,5 мг $[^3\text{H}]$ Асп-апамина (фракция 5, рис. 1) на колонке (0,5×130 см) с сефадексом G-25 sf в 0,1 М АсОН. Скорость элюирования 0,8 мл/ч; поглощение при 206 нм (I), при 280 нм (2), радиоактивность (3)

полимера и удаления всех, кроме ацетамидометильной, защитных групп пептидполимер обрабатывали жидким фтористым водородом в присутствии анизола и метионина в течение 1 ч при 0° С.

Выделение и хроматографическую очистку полученного пептида осуществляли в условиях работы [9], с тем отличием, что перед хроматографией на целлюлозе СМ-52 проводилось обессоливание на сефадексе G-10, а пептиды обнаруживали не методом Лоури, а спектрофотометрически по поглощению при 206 нм, а также по радиоактивности полученных фракций (рис. 1). При хроматографии на СМ-целлюлозе СМ-52 (рис. 1) основная радиоактивность сосредоточена во фракции 5, которая элюируется 0,2 М ацетатом аммония, т. е. в тех же условиях, в которых элюировался Асп-апамин в работе [9]. В целом хроматографические профили на рис. 1 и в работе [9] имеют значительное сходство. Авторы работы [9] фракцию Асп-апамина хроматографировали на сефадексе G-25SF и получили при этом только один пик (регистрация по поглощению при 235 нм). Мы провели гель-фильтрацию в сходных условиях (рис. 2) и при этом от основной фракции, в которой была сосредоточена вся радиоактивность, была отделена примесь (детектирование при 206 нм) низкомолекулярного нерадиоактивного продукта. Аминокислотный состав радиоактивного $[^3\text{H}]$ Асп-апамина (табл. 1) в основном согласуется с таковым для природного апамина, а его выход в расчете на неочищенный продукт после обработки фтористым водородом и обессоливания на сефадексе G-10 составил 20%. Меньший, чем в работе [9] (50%), выход может быть связан как с тем, что перед хроматографией на СМ-целлюлозе СМ-52 мы ввели дополнительную стадию обессоливания на сефадексе G-10 (без которой нам не удавалось воспроизвести хроматографическую картину, описанную в [9]), так и с различиями в наборе использованных защитных групп.

Сравнение молярной радиоактивности $[^3\text{H}]$ Асп-апамина и удельной радиоактивности использовавшегося Вос-Cys ($[^3\text{H}]$ Асп)-ОН выявило, как и следовало ожидать, две $[^3\text{H}]$ Асп-группы ($2,0 \pm 0,05$). Из рис. 1 видно, что радиоактивность присутствует также во фракциях 1 и 2, однако она соответствует лишь 0,07 и 0,3 $[^3\text{H}]$ Асп-групп на 1 моль пептида. Данные

Данные аминокислотного анализа

Аминокислоты	[³ H]Асп-апамин	Синтетический апамин	Нативный апамин	Теоретическое значение
Asn } Asp } Thr } Gln } Glu }	1,04	1,02	1,00	1 0 1 2 1
Pro	1,00	1,00	0,97	1
Ala	3,00	2,95	2,97	3
Cys *	1,75	1,55	2,05	4
Leu	0,98	1,00	0,94	1
His	0,80	0,80	0,86	1
Lys	0,92	0,93	0,95	1
Arg	2,01	2,00	1,94	2

* Специально анализ для определения цистеина не проводили.

аминокислотного анализа обнаруживают в этих фракциях завышенное по сравнению с апамином содержание глутаминовой кислоты и заниженное содержание лизина, однако они не позволяют однозначно ответить на вопрос, соответствуют ли эти радиоактивные фракции «ложным» пептидам или в них присутствует и частично деблокированный [³H]Асп-апамин. Полученные результаты показывают, что фракция, содержащая нужный пептид с интактными Асп-защитными группами, является преобладающей. Тем самым подтверждается достаточно высокая стабильность этой защитной группировки в условиях синтеза и последующей обработки фтористым водородом.

Удаление SH-защитных групп (Асп и [³H]Асп) проводили действием ацетата ртути в кислых условиях [13]. После обработки дитиотреитом и центрифугирования супернатант обессоливали на колонке с сефадексом G-10 в 0,1 М уксусной кислоте. Пептидную фракцию подщелачивали 0,1 М NH₄OH до pH 8,5 и окисляли кислородом воздуха при 20°С в течение 48 ч. Указанные условия реокисления, как и последующая хроматография на биорексе 70 в 0,13 М ацетате аммония, pH 8,3, предложенные в работе [9], были приняты нами после того, как мы убедились, что в случае восстановленного природного апамина они приводят к желаемому продукту с выходом ~20%. Полученный таким образом реокисленный апамин оказался гомогенным и в условиях использовавшейся нами ранее [12] хроматографии на биорексе 70 в градиенте 0,05–0,5 М аммонийацетатного буфера, pH 7,5.

На рис. 3а представлен профиль разделения реокисленного синтетического апамина, аналогичный кривой элюции, приведенной в работе [9]. Этимеченная фракция отвечает апамину и лишена радиоактивности, что указывает на полноту удаления [³H]Асп-групп. Эта фракция подвергнута рехроматографии в аналогичных условиях.

Полученный синтетический апамин не отличался от природного апамина по токсичности (*LD*₅₀ 3,5 мг/кг при внутривенном введении мышам), данным аминокислотного анализа и хроматографии на биорексе 70 (рис. 3б, в) и на пластинках с закрепленным слоем силикагеля в условиях работы [16]. Синтетический и природный апамин имеют также одинаковые спектры КД (рис. 4), что, как было показано нами ранее [12], является существенным критерием их идентичности.

В данной работе мы сравнили синтетический и природный апамин с помощью спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Такое исследование

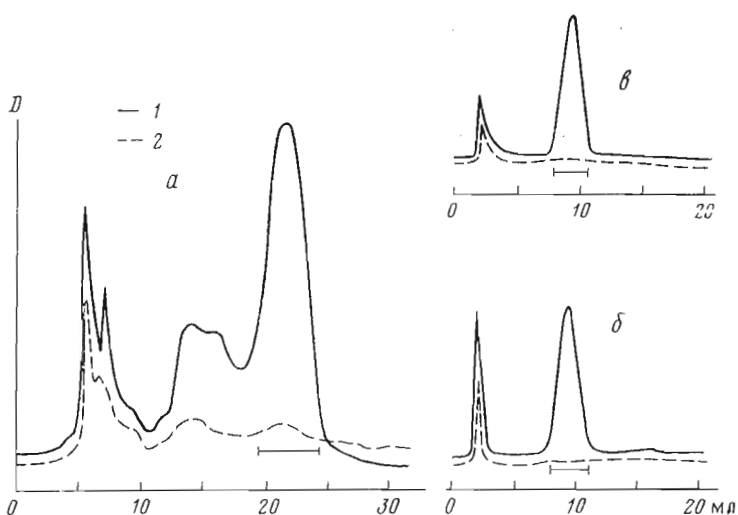


Рис. 3. Хроматография синтетического апамина на колонке (0,5×30 см) с биорексом 70, уравновешенным 0,13 М NH_4OAc , pH 8,3 (а). Скорость элюирования 3,0 мл/ч. Рехроматография синтетического (б) и природного апамина (в) (по 0,2 мг) в том же буфере на колонке (0,5×10 см) с биорексом 70. Скорость элюирования 2,4 мл/ч. Отмечены фракции, содержащие апамин. Поглощение при 206 нм (1), при 280 нм (2)

стало возможным благодаря недавно проведенному детальному ЯМР-анализу природного апамина и его химически модифицированных аналогов [17, 18].

На рис. 5–7 приведены спектры ^1H -ЯМР природного и синтетического апамина после дейтериеобмена лабильных протонов. Обращает на себя внимание подобие этих спектров. Единственным отличием является присутствие в спектре синтетического образца добавочного сигнала X при 8,7 м.д. интенсивностью 1,7 протонных единиц (за 1 протонную единицу принята интенсивность сигнала при 7,6 м.д., отвечающего гистидиновому $\text{C}_{(4)}$ -протону). Очевидно, наличие примеси не отразилось на спектрах КД и токсичности. Аналогичное явление обнаружено в работах [19, 20], где показано, что даже полная модификация некоторых остатков в природном апаmine не приводит к заметному изменению этих характеристик.

Сигнал X, природа которого остается неясной (синглет мог бы отвечать ароматическим протонам недосвятой бензильной группировки, однако он занимает аномально низкополюсное положение), при уменьшении pH изменяет свою полуширину и смещается в более высокое поле. pH-Зависимость сигнала X (рис. 8) объясняется влиянием пространственно сближенной кислой группы с pK 3,6. Такое pK в природном апаmine имеет карбоксильная группа остатка Glu^7 [17, 18]. Поскольку она сближена с оксигруппой остатка Thr^8 , можно предположить, что сигнал X отвечает примеси с модифицированной боковой цепью этого остатка.

После выдерживания синтетического апамина в HCl при pH 1,2 в течение 16 ч (20°C) и хроматографии на колонке с сефадексом G-10, уравновешенной 0,08 н. HCl, получается продукт, спектр ^1H -ЯМР которого не содержит сигнала X (см. рис. 5в) и идентичен спектру природного апамина.

На рис. 6 и 7 указано отнесение сигналов, выполненное на природном апаmine [17, 18]. В области 1–4 м.д. находятся сигналы протонов боковых цепей аминокислотных остатков, а в области 4–5,5 м.д. лежат сигналы C^αH -протонов основной цепи. Некоторые различия в спектрах синтетического и природного апамина в районе 3,5 м.д. могут объясняться присутствием примесей, количество которых не превышает 5–10%, а разли-

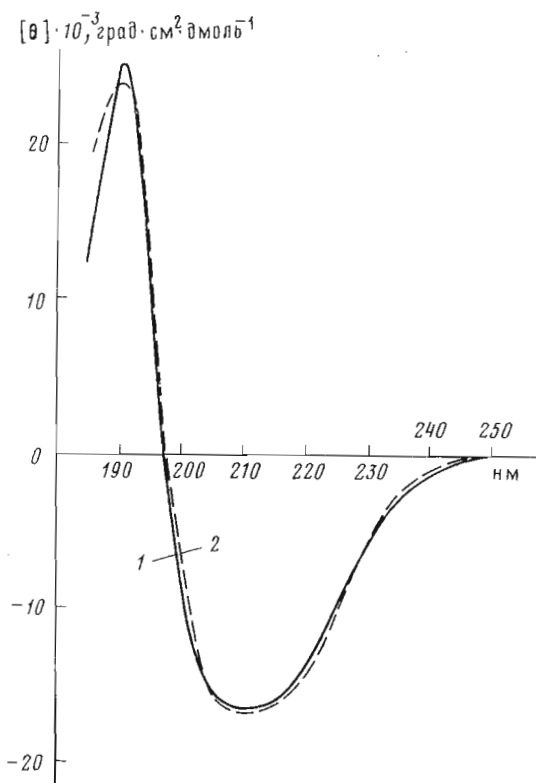


Рис. 4. Кривые КД в H_2O нативного (1) и синтетического апамина (2). Приведены значения $[\theta]$ в расчете на один остаток

чия при 4,8–5,2 м.д. связаны с частичным насыщением сигналов при подавлении сигнала воды дополнительной частотой. Из рассмотрения области спектра 1–4 м.д. можно сделать вывод об отсутствии заметной рацемизации, поскольку она привела бы к изменению химических сдвигов протонов боковых цепей остатков с инвертированной конфигурацией. В целом значительное подобие спектров (а в большей части и полная их идентичность) свидетельствует об идентичности химической структуры природного и синтетического апамина.

Экспериментальная часть

В работе использовались аминокислоты и их производные, выпускаемые фирмами Reanal (ВНР), Fluka (Швейцария), Pierce (США) и Protein Research Foundation (Япония). Снятие $[^3H]Asm$ -апамина с полимера и деблокирование функциональных групп жидким HF проводили в приборе Сакакибары [21]. Гидролиз аликвоты аминокислотного полимера проводили после удаления Вос- и Dnp-групп в течение 24 ч при $110^\circ C$ в смеси диоксан – HCl (1 : 1) в запаянной под вакуумом ампуле. Кислотный гидролиз пептидов осуществляли 6 н. HCl 24 ч при $110^\circ C$. Аминокислотные анализы выполнены на аминокислотном анализаторе «Duglum D-500» (США). При колоночной хроматографии контроль разделения осуществляли с помощью детектора «Uvicord III» (ЛКВ, Швеция). Радиоактивность $[^3H]Asm$ -апамина и остальных фракций после хроматографии измеряли с помощью счетчика «Intertechnique» (Франция) в унисольве I (Koch-Light). Удельное вращение измеряли при $20^\circ C$ на спектрополяриметре

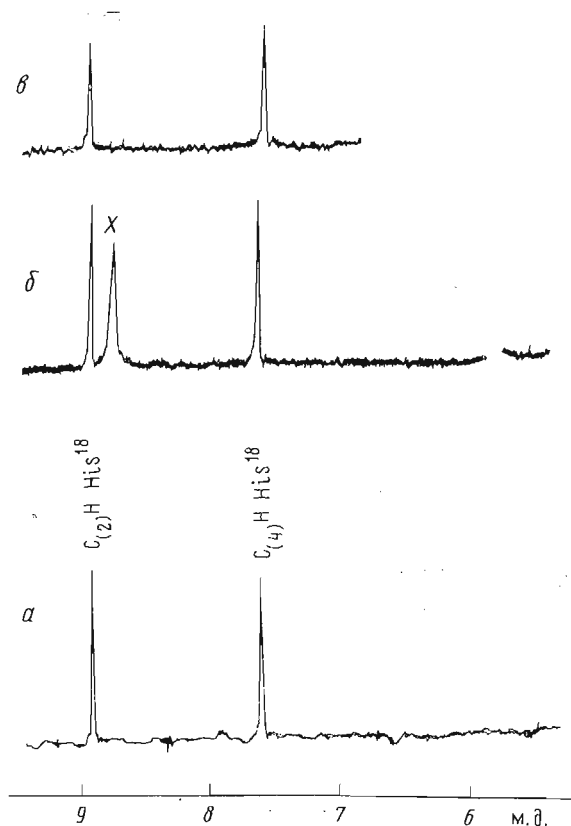


Рис. 5. Спектры ^1H -ЯМР природного (а) и синтетического (б) апамина, а также синтетического апамина после обработки при рН 1,2 (в) (c $0,9 \cdot 10^{-3}$ М, D_2O , 32°C , 300 МГц), приведена область 9–5,5 м.д. X — неидентифицированный сигнал

«Perkin-Elmer 141» (США), длина кюветы 10 см. ТСХ синтетического и природного апамина (R_f 0,35) проводили на пластинках с закрепленным слоем силикагеля «Eastman 6060 Silica Gel» (Kodak, США) в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин (30 : 6 : 24 : 20) [16] (обнаружение нингидрином). Кривые КД получены на дихрографе «Jobin-Yvon, Франция) при $23-26^\circ\text{C}$ в H_2O (c $1,67-1,80 \cdot 10^{-4}$ М). Спектры ^1H -ЯМР сняты на приборе «Varian CS-300» (США).

$[^3\text{H}]$ Ацетамид. Через 4 мл $[^3\text{H}]$ уксусного ангидрида уд. акт. 55 000 имп/мин·мкмоль) при охлаждении до $-10-0^\circ\text{C}$ пропускали сухой NH_3 в течение 40 мин. К образовавшемуся твердому продукту добавляли горячий этилацетат (1×20 мл), растирали при медленном нагревании, образующуюся суспензию отфильтровывали, остаток на фильтре промывали горячим этилацетатом (6×20 см), а затем сухим хлороформом (2×15 мл). Объединенные фильтраты упаривали в вакууме при 30°C и остаток дважды перекристаллизовывали из смеси бензол — этилацетат. Выход 1,01 г (40%), уд. акт. 27 200 имп/мин·мкмоль, т. пл. $81-83^\circ\text{C}$, для нерадииоактивного продукта 81, 82– 83°C [22].

$[^3\text{H}]$ Ацетамидомеганола синтезировали, как описано в работе [23], из 10,0 г $[^3\text{H}]$ ацетамида (уд. акт. после разбавления немеченым ацетамидом 2720 имп/мин·мкмоль), 15 мл формалина и 2,0 г K_2CO_3 . Получающийся маслообразный продукт закристаллизовался при $-5-0^\circ\text{C}$. Выход 10,50 г (70%), уд. акт. 2720 имп/мин·мкмоль.

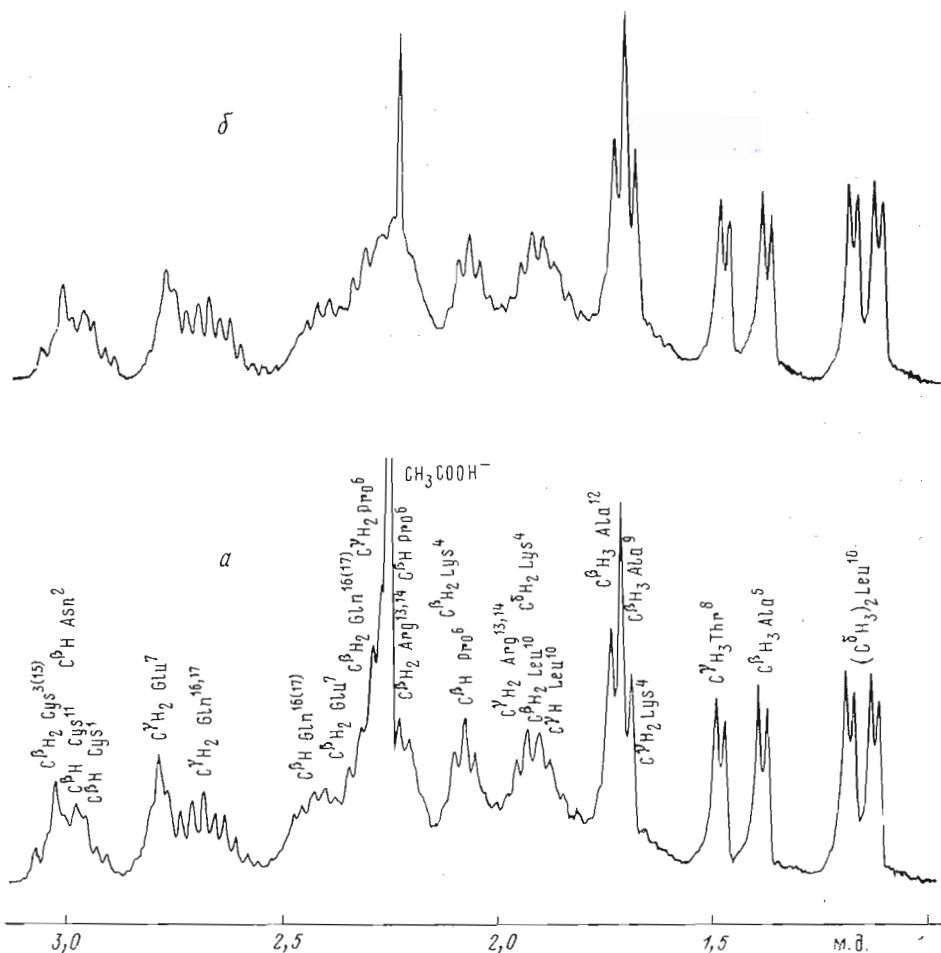


Рис. 7. Спектры ^1H -ЯМР природного (а) и синтетического (б) апамина (приведена область 3,2—1 м.д.)

рофенил)гистидин (0,84 г, 2,0 ммоль) присоединяли к полимеру в присутствии 0,412 г (2,0 ммоль) дидиклогексилкарбодимида в смеси диметилформамид — хлористый метилен (1:3). После повторной конденсации содержание гистидина 0,2 ммоль/г полимера. После промывок (шаги 24—27 программы) свободные аминогруппы полимера ацетилировали ацетилимидазолом в хлористом метиле [15].

Наращивание пептидной цепи проводили на автоматическом синтезаторе с использованием следующего цикла операций, начиная с удаления Вос-группы.

Шаг 1. Промывка хлористым метиленом (3×1,5 мин).

Шаг 2. Промывка 30% раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле (1×1,5 мин).

Шаг 3. Обработка 30% раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле (1×30 мин).

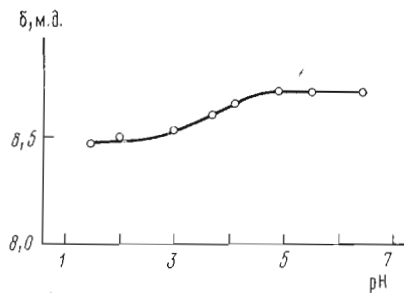


Рис. 8. pH-Зависимость сигнала X

- Шаги 4–6. Промывка хлористым метиленом, хлороформом и абс. этанолом (3×1,5 мин).
- Шаг 7. Промывка 10% раствором Et₃N в хлористом метиле (2×1,5 мин).
- Шаг 8. Нейтрализация 10% Et₃N в хлористом метиле (1×10 мин).
- Шаги 9–11. См. шаги 4–6.
- Шаг 12. Прибавление 2,5-кратного избытка Вос-аминокислоты в хлористом метиле (1×5 мин).
- Шаг 13. Прибавление 2,5-кратного избытка дициклогексилкарбодимида в хлористом метиле (1×1,5 мин).
- Шаг 14. Перемешивание (1×12 ч).
- Шаг 15. Промывка хлористым метиленом (3×1,5 мин).
- Шаг 16. Промывка 5% раствором Et₃N в хлористом метиле (3×1,5 мин).
- Шаги 17–19. См. шаги 4–6.
- Шаг 20. Промывка диметилформамидом (5×1,5 мин).
- Шаг 21. См. шаг 12.
- Шаг 22. См. шаг 13.
- Шаг 23. Перемешивание (1×6 ч).
- Шаги 24–26. См. шаги 4–6.
- Шаг 27. См. шаг 20.
- Шаг 28. Промывка хлористым метиленом (5×1,5 мин). Конденсацию с нитрофениловыми эфирами глутамина и аспарагина осуществляли по следующей программе:
- Шаг 12а. Промывка диметилформамидом (5×1,5 мин).
- Шаг 13а. Прибавление 5-кратного избытка нитрофенилового эфира Вос-аминокислоты в диметилформамиде (1×5 мин).
- Шаг 14а. Перемешивание (1×24 ч).
- Шаг 15а. См. шаг 12а.
- Шаг 16а. Промывка хлористым метиленом (3×1,5 мин).
- Шаг 17а. Промывка 5% раствором Et₃N в хлористом метиле (2×1,5 мин).
- Шаг 18а. Обработка 5% раствором Et₃N в хлористом метиле (1×10 мин).
- Шаг 19а. Промывка хлористым метиленом (5×1,5 мин).
- Шаг 20а. См. шаг 12а.
- Шаги 21а, 22а. См. шаги 13а, 12а.

После завершения синтеза Вос-группу удаляли 30% раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле. Dnp-группу гистидина удаляли по методике [7]. После многократных промывок диметилформамидом и хлористым метиленом пептидполимер сушили в вакууме при 20° С.

Отщепление пептида от полимера, удаление защитных групп и очистка [³H]Асп-апамина. 1 г пептидполимера обрабатывали 10 мл жидкого HF (1 ч, 0° С) в присутствии 1 мл анизол и 50 мг метионина. После удаления HF в вакууме остаток экстрагировали 10% АсОН (3×20 мл), объединенные экстракты промывали эфиром (3×20 мл), водную фазу лиофилизировали. Получили 310 мг неочищенного [³H]Асп-апамина (теоретический выход продукта 276 мг).

200 мг [³H]Асп-апамина растворяли в 2 мл 0,1 М АсОН и обессоливали на колонке (2,5×30 см) с сефадексом G-10. Полученный после лиофилизации продукт (100 мг, 56% от теоретического) растворяли в 2 мл 0,03 М NH₄OAc, pH 5,5, наносили на колонку (2×6 см) с СМ-целлюлозой СМ-52, уравновешенной тем же буфером, и проводили хроматографию, как указано в подписи к рис. 1. После лиофилизации фракции 5 получали 23,2 мг (23,2% в расчете на вещество, выделенное хроматографией на сефадексе G-10) продукта, который хроматографировали порциями по 2,5 мг на колонке (0,5×130 см) с сефадексом G-25sf (рис. 2). Всего получено 20 мг [³H]Асп-апамина.

Удаление Асп-, [³H]Асп-групп, окисление сульфгидрильных групп и очистку синтетического апамина на биорексе 70 (рис. 3а) проводили в

условиях работы [9]. Из 22 мг [^3H]Асм-апамина после хроматографии на биорексе 70 получено 0,74 мг (3,8%) апамина (фракция 3, рис. 3а), после рехроматографии на биорексе 70 (колонка 0,5×10 см) в тех же условиях (рис. 3б) выход составил 0,63 мг (3,3%) в расчете на [^3H]Асм-апамин.

Авторы выражают благодарность Л. Б. Сенявиной за съемку спектров КД и В. П. Мальковой за определение активности природного и синтетического апамина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Habermann E. (1972) *Science*, **177**, 314–322.
2. Banks V. E. C., Sinclair N. M., Vernon C. A. (1978) *Proceeding of the third symposium on plant, animal and microbial toxins* (Habermehl G., Mebs D., eds.), pp. 65–77.
3. Habermann E., Fischer K. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **94**, 355–364.
4. Rietschoten J. Van., Granier C., Rochat H., Lissitzky S., Miranda E. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **56**, 35–40.
5. Нуриддинов А. Р., Жукова Г. Ф., Елякова Е. Г., Цетлин В. И., Иванов В. Т. (1977) Тезисы четвертого всесоюзного симпозиума по химии белков и пептидов, с. 162, Минск.
6. Rietschoten J. Van., Pedroso Muller E., Granier C. (1977) *Peptides* (Goodman M., Meienhofer J., eds.), A Halsted Press Book, John Wiley and Sons, New York – Toronto, 522–524.
7. Cosand W. L., Merrifield R. B. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2771–2775.
8. Нуриддинов А. Р., Жукова Г. Ф., Цетлин В. И., Иванов В. Т. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1322–1333.
9. Sandberg V. E. B., Ragnarsson U. (1978) *Int. J. Peptide and Protein Res.*, **11**, 238–245.
10. Granier C., Pedroso Muller E., Rietschoten J. Van. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **82**, 293–299.
11. Sandberg V. E. B. (1979) *Int. J. Peptide and Protein Res.*, **13**, 327–333.
12. Нуриддинов А. Р., Елякова Е. Г., Малькова В. Н., Цетлин В. И., Иванов В. Т. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1314–1321.
13. Veber D. F., Milkowski J. D., Varga S. L., Denkwalter R. G., Hirschmann R. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, **15**, 5456–5461.
14. Kamber V. (1971) *Helv. chim. acta*, **54**, 927–930.
15. Markley L. D., Dorman C. L. (1970) *Tetrahedron Lett.*, 1787–1790.
16. Gauldie J., Hanson J. M., Rumjanek F. D., Shipolini R., Vernon G. A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **61**, 369–376.
17. Bystrov V. F., Arseniev A. S., Gavrilov Yu. D. (1978) *J. Magn. Res.*, **30**, 151–184.
18. Оханов В. В., Афанасьев В. А., Гуревич А. В., Елякова Е. Г., Мирошников А. И., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. (1980) *Биоорг. химия*, **6**, 840–864.
19. Vincent J. P., Schweits H., Lazdunski M. (1975) *Biochemistry*, **14**, 2521–2525.
20. Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. Б., Сенявина Л. Б. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1022–1028.
21. Sakakibara S., Schimonishi Y., Kishida V., Okada M., Sugihara H. (1967) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40**, 2164–2167.
22. Справочник химика (1971) т. 11, с. 453, «Химия».
23. Einhorn A. (1905) *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **343**, 207–209.

Поступила в редакцию
23.V.1980

SOLID-PHASE SYNTHESIS OF APAMIN. USE OF RADIOACTIVE ACETAMIDOMETHYL PROTECTING GROUP

NURIDDINOV A. R., OKHANOV V. V., TSETLIN V. I., IVANOV V. T.

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

Apamin, a neurotoxin from the bee venom, has been synthesized by solid-phase procedure using benzhydrylamine resin. The Cys⁴ and Cys³ residues were incorporated as *tert*-butyloxycarbonyl-S-(^3H -acetamidomethyl)cysteine which considerably facilitated the detection of ^3H -Acm-apamin during the chromatographic purification as well as the control of the subsequent removal of ^3H -Acm groupings. After oxidation of sulphydryl groups and purification steps, the peptide was obtained identical to apamin by chromatographic behaviour, toxicity, CD curves, and high resolution ^1H NMR spectra.