



УДК 547.96.07

СИНТЕЗ И НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ПЕПТИДА δ -СНА И ЕГО АНАЛОГОВ*Саргсян А. С., Сумская Л. В., Александрова И. Ю.,
Безруков М. В., Михалева И. И., Иванов В. Т.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва**Балабан П. М.**НИИ по биологическим испытаниям химических соединений, ММП, Купавна*

С целью структурно-функционального изучения пептида δ -сна (Delta-Sleep Inducing Peptide) синтезированы DSIP и 11 его аналогов: а) аналоги, содержащие остаток Тут в одном из положений 6–9 молекулы DSIP; б) аналоги с остатком *D*-Ala в одном из положений 2–4, аналог с остатком Ava вместо дипептидного звена Gly-Gly (положения 3–4) и undekaпептидный аналог, соответствующий последовательности DSIP, удлинённой с N-конца на дипептидный фрагмент Gly-Pro; в) производные DSIP с амидированными остатками двухосновных кислот, т. е. содержащие Asp вместо Asp или Glu-NH₂ вместо Glu. Синтез осуществлен конденсацией двух блоков, каждый из которых получен ступенчатым наращиванием цепи с C-конца. Показано, что DSIP и некоторые из его аналогов оказывают специфическое и избирательное действие на клеточные электрофизиологические модели – нейроны виноградной улитки, вызывая уменьшение частоты спонтанной импульсной активности в среднем на 30–40% и гиперполяризационный сдвиг потенциала покоя на 1–4 мВ. Обсуждаются результаты тестирования сомногенного действия DSIP на животных (крысы, кролики, кошки).

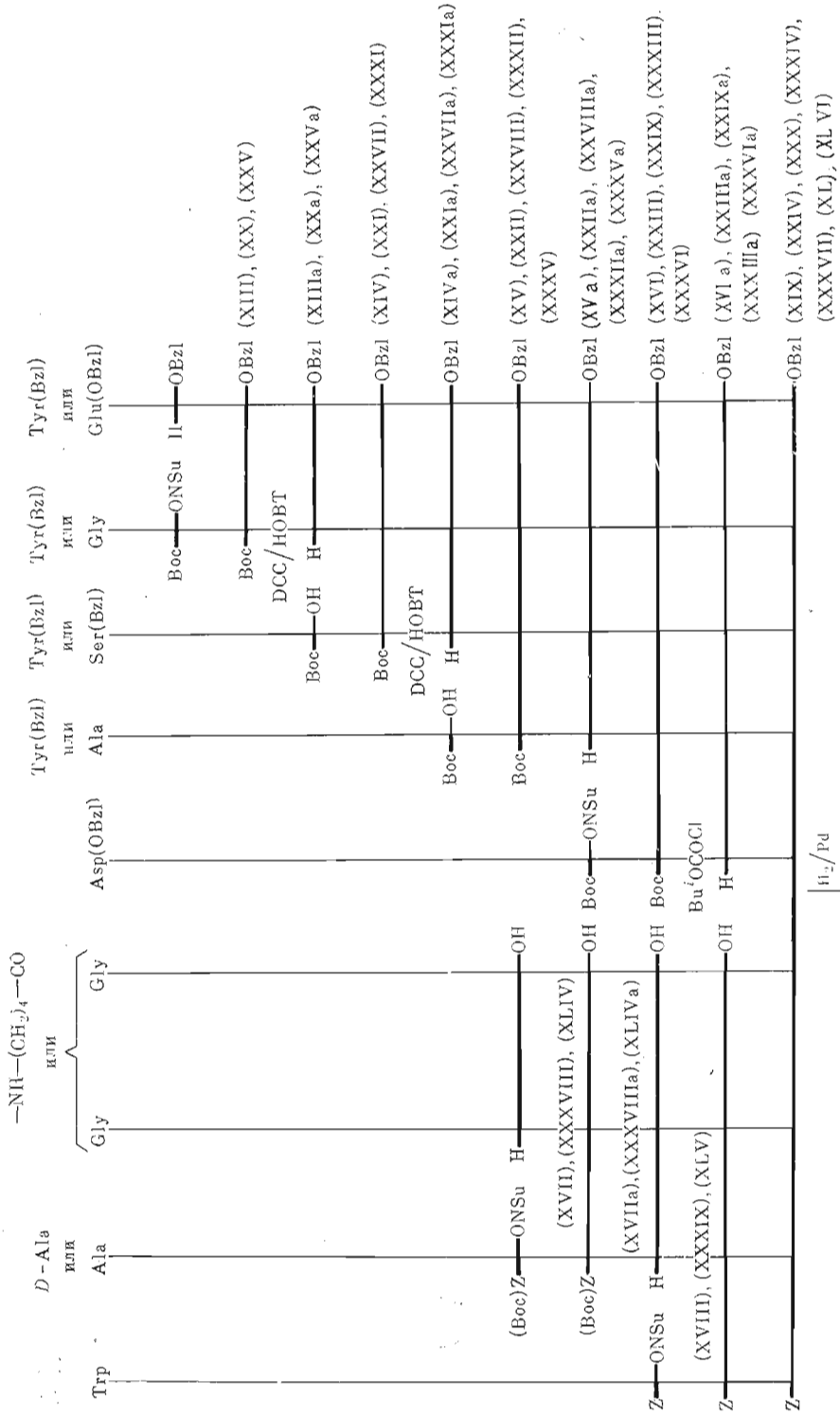
В ряде работ описаны попытки выделения и идентификации гуморальных факторов мозга, вовлеченных в процесс возникновения и поддержания сна [1–6]. Однако лишь для одного из них к настоящему времени установлена первичная структура: в 1977 г. Монье и сотр. [5] показали, что выделенный пептид, по их данным индуцирующий у кроликов поведенческие и электроэнцефалографические изменения, характерные для медленноволнового сна (δ -сна), представляет собой нонапептид (I).

Структура этого пептида была подтверждена синтезом; полученный продукт обладал полной активностью природного фактора [5]. Было также показано, что фрагменты δ -пептида биологически неактивны.

В целях изучения взаимосвязи между структурой, пространственным строением и биологической функцией этого нового нейропептида нами

В работе приняты стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB; кроме того, использованы следующие сокращения: Ava – остаток δ -аминовалериановой кислоты $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-$, Bzl(Cl₂) – 2,6-дихлорбензил, DCC – N,N-дипциклогексилкарбодимид, НОВТ – 1-оксибензотриазол, DMF – диметилформамид.

Схема 1



(I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII)

был предпринят синтез природного фактора (I) и ряда его аналогов (II) — (XII)*:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	Trp	Ala	Gly	Gly	Asp	Ala	Ser	Gly	Glu	(I)
	—————Tyr									(II)
	—————Tyr									(III)
	—————Tyr									(IV)
	—————Tyr									(V)
	—————Ava									(VI)
Gly-Pro	—————									(VII)
	———D-Ala									(VIII)
	—————D-Ala									(IX)
	—————D-Ala									(X)
	—————Glu-NH ₂									(XI)
	—————Asn									(XII)

Тирозинсодержащие аналоги (II) — (V) предполагалось использовать для анализа пространственной структуры спектральными методами [7], а также для получения радиоактивно меченных ¹²⁵I-производных иодированием тирозина; последние необходимы для изучения механизма действия пептида δ-сна и его локализации в мозге радиоиммунохимическими методами.

Поскольку DSIP является хорошим субстратом для экзо- и эндопептидаз мозга [9], представляло интерес получение аналогов, более устойчивых к протеолизу, чем исходный пептид. С этой целью синтезированы:

* Предварительные сообщения см. [7, 8].

к схеме I

- (XIII) Boc-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XIV) Boc-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XV) Boc-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XVI) Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XVII) Z-Ala-Gly-Gly-OH
- (XVIII) Z-Trp-Ala-Gly-Gly-OH
- (XIX) Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XX) Boc-Gly-Tyr(Bzl)-OBzl
- (XXI) Boc-Ser(Bzl)-Gly-Tyr(Bzl)-OBzl
- (XXII) Boc-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Tyr(Bzl)-OBzl
- (XXIII) Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Tyr(Bzl)-OBzl
- (XXIV) Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Tyr(Bzl)-OBzl
- (XXV) Boc-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXVI) Boc-Tyr(Bzl Cl₂)-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXVII) Boc-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXVIII) Boc-Ala-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXIX) Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXX) Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXXI) Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXXII) Boc-Ala-Tyr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXXIII) Boc-Asp(OBzl)-Ala-Tyr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXXIV) Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Tyr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXXV) Boc-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXXVI) Boc-Asp(OBzl)-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXXVII) Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XXXVIII) Boc-Ala-Ava-OH
- (XXXIX) Z-Trp-Ala-Ava-OH
- (XL) Z-Trp-Ala-Ava-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl
- (XLIV) Z-D-Ala-Gly-Gly-OH
- (XLV) Z-Trp-D-Ala-Gly-Gly-OH
- (XLVI) Z-Trp-D-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl

Схема 2

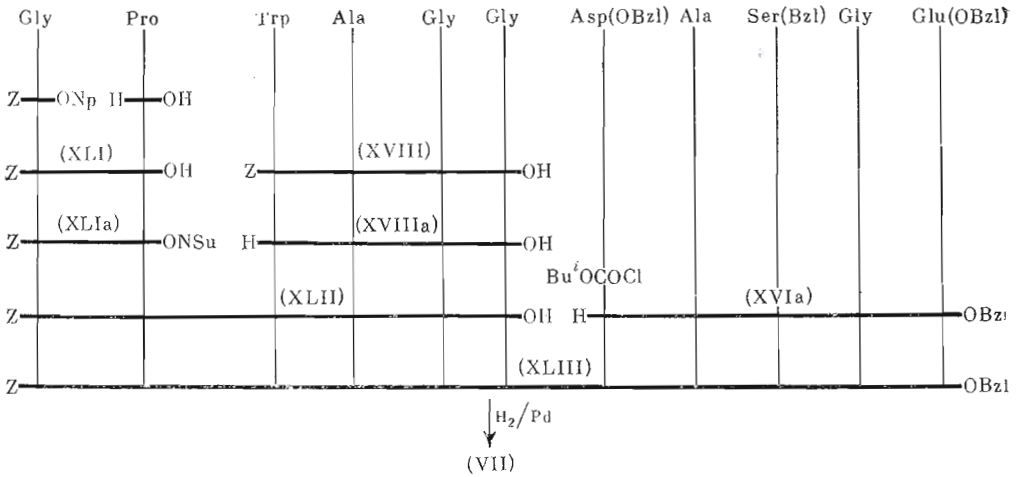
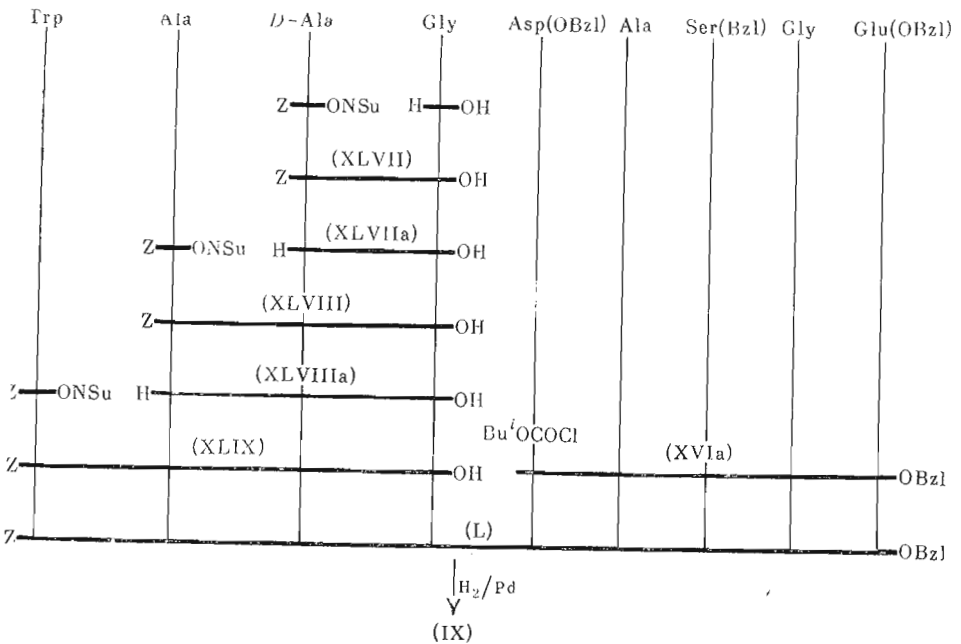


Схема 3

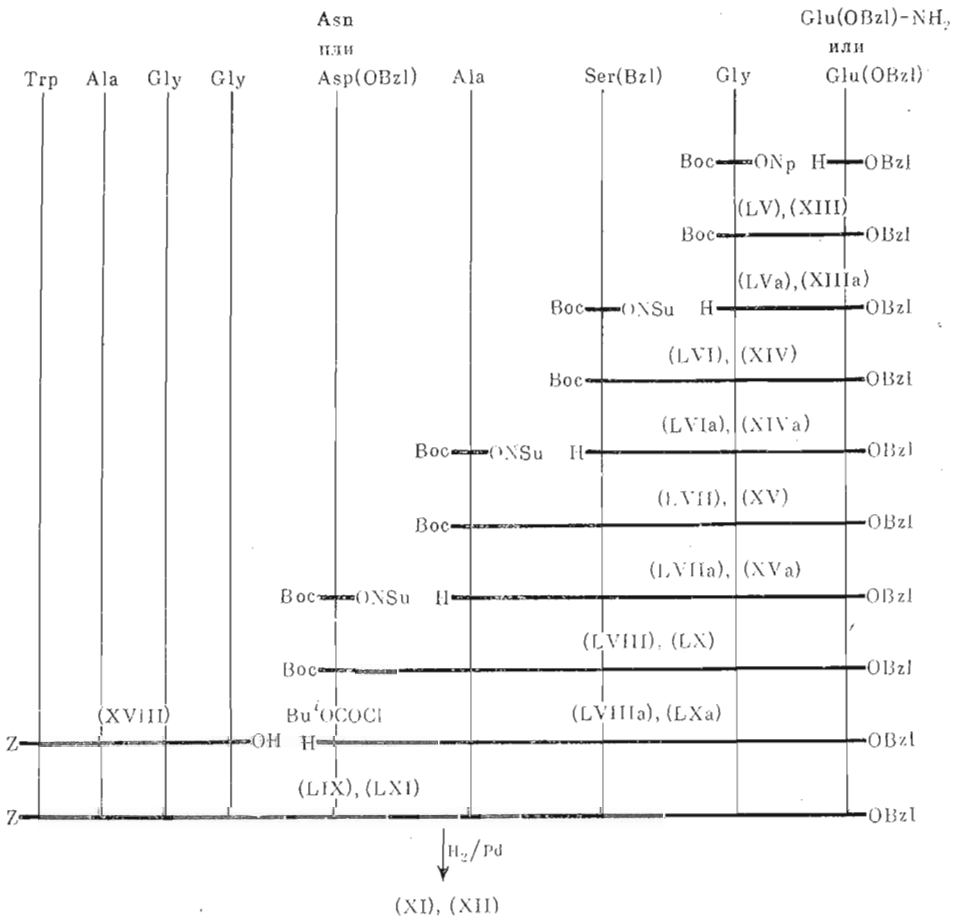
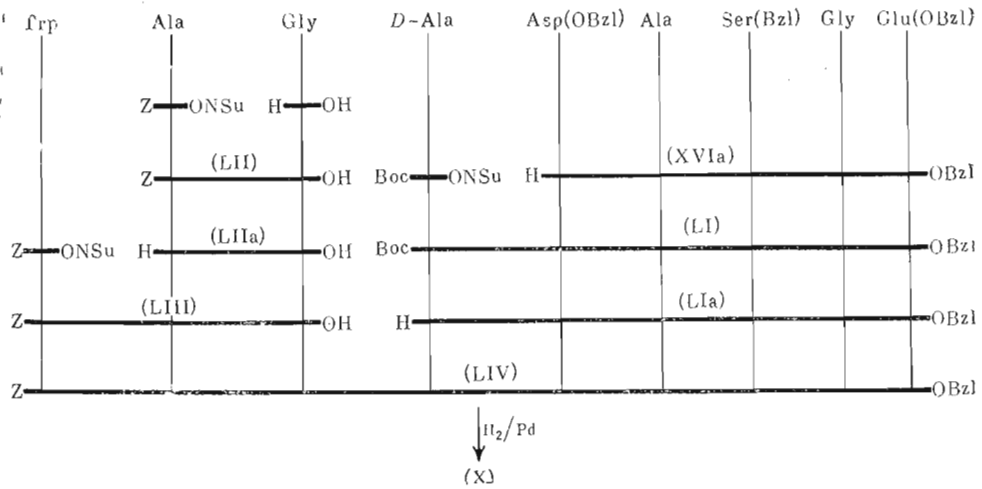


аналог (VI), содержащий остаток δ -аминовалериановой кислоты вместо фрагмента Gly³-Gly⁴, т. е. отличающийся от нативного пептида заменой амидной связи на участке -Gly-Gly- на звено -CH₂-CH₂-, и аналоги (VIII) - (X), отличающиеся от DSIP присутствием остатков D-Ala в положениях 2, 3 и 4. Кроме того, учитывая имеющиеся указания о том, что введение с N-конца пролиновых остатков может затруднять протеолиз, в частности под действием аминокпептидаз [10], мы получили также аналог (VII), удлиненный по сравнению с DSIP на звено Gly-Pro.

С помощью аналогов (XI) - (XII), содержащих амидированные карбоксильные группы, предполагалось оценить важность ионогенных COOH-групп для проявления пептидом биологической активности.

DSIP и его аналоги синтезированы в растворе классическими методами по схемам 1-5, включающим в себя конденсацию двух защищенных пептидных блоков, выбранных таким образом, чтобы активизируемый в ходе

Схема 4



- (LV) Boc-Gly-Glu(OBzl)-NH₂
- (LVI) Boc-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-NH₂
- (LVII) Boc-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-NH₂
- (LVIII) Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-NH₂
- (LIX) Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-NH₂
- (LX) Boc-Asn-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-NH₂
- (LXI) Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asn-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-NH₂

конденсации блок имел на С-конце оптически неактивный остаток глицина.

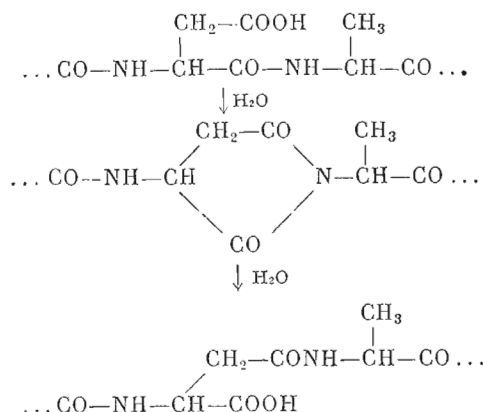
Для блокирования боковых цепей остатков Asp, Ser, Glu и Glu-NH₂ были выбраны бензиловые эфиры, а для N^α-функции — бензилоксикарбонильная (Z) или *tert*-бутилоксикарбонильная (Boc) группировки. Для защиты оксигруппы тирозина первоначально планировали использовать 2,6-дихлорбензиловую группу [11]. Однако ее удаление каталитическим гидрированием уже на стадии дипептида (XXVI) протекало неудовлетворительно, поэтому выбор был остановлен на бензильной группе. Синтез каждого из фрагментов осуществляли последовательным наращиванием цепи с С-конца методом N-оксисукцинимидных и *n*-нитрофениловых эфиров или с помощью DCC в присутствии НОВТ.

Вос-защитные группы удалялись с помощью 50–75% CF₃COOH в CH₂Cl₂, а в случае тирозинсодержащих пептидов — трехкратным избытком эфирата трифторида бора в уксусной кислоте при 4° С. Применение этого реагента позволило свести к минимуму побочную реакцию O→С-миграции бензильной группы фенольного гидроксила тирозина, имеющую место при использовании ацидолитических реагентов — 25% CF₃COOH в хлористом метиле или уксусной кислоте [12].

Защищенные пептиды очищали кристаллизацией, их индивидуальность и чистоту контролировали тонкослойной хроматографией и аминокислотным анализом (гидролиз 6 н. HCl).

В ходе поиска оптимального метода конденсации двух блоков был опробован ряд активирующих и конденсирующих агентов.

При конденсации двух блоков методами N-оксисукцинимидных или пентафторфениловых эфиров выходы гомогенного по ТСХ защищенного нонапептида (XIX) (схема 1) составляли лишь 10 и 50% соответственно, а в случае применения DCC/НОВТ продукт реакции оказался хроматографически неоднородным. Гидрирование полученного последним способом защищенного нонапептида (XIX) и последующее фракционирование на DEAE-сефадексе А-25 привели к получению трех фракций (а–с) (рис. 1). По данным аминокислотного анализа кислотного и ферментативного (лейцинаминопептидаза) гидролизатов, фракция с представляла собой целевой нонапептид, фракция а образовалась в результате неполного гидрирования, а фракция b скорее всего представляла собой продукт α→β-транспептидации, протекающей с промежуточным образованием циклического имида [13]:



Защищенный нонапептид (XIX) был получен с высоким выходом (73%) модифицированным методом смешанных ангидридов (так называемый REMA-синтез [14], с изобутилхлорформиатом). Этим же способом получали защищенные пептиды и при синтезе аналогов DSIP. Для контроля чистоты защищенных пептидов, являющихся продуктами блочной конденсации [(XIX), (XXIV), (XXX), (XXXIV), (XXXVII), (XL),

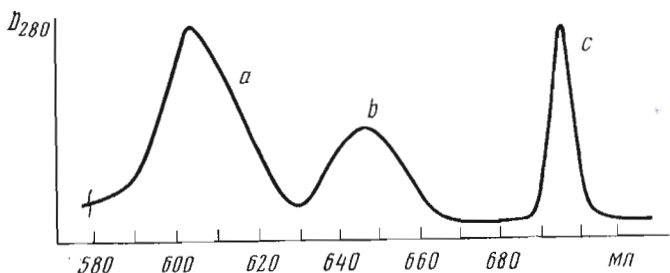


Рис. 1. Хроматографическое разделение DSIP, полученного DCC/НОВТ-методом на DEAE-сефадексе А-25 (колонка 1×100 см, 0,3 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, рН 6,7, нагрузка 20 мг)

(XLIII) — схема 2, (XLVI) — схема 1, (L) — схема 3, (LIV) — схема 4, (LIX), (LXI) — схема 5], помимо ТСХ и аминокислотного анализа, использовали высокоэффективную хроматографию в режиме эксклюзии на колонке с силасорбом 600 в DMF [15]. В качестве примера на рис. 2 показан профиль элюции защищенного нонапептида (XIX).

Удаление защитных групп проводилось в одну стадию каталитическим гидрированием над Pd-чернью в DMF, содержащем 1% уксусной кислоты и до 40% воды, которая добавлялась для растворения выпадающего в ходе реакции пептида. Гидрирование защищенного DSIP (XIX) протекало за 4 ч; в случае остальных нонапептидов гидрирование длилось 10–20 ч. Полученные продукты подвергались очистке ионообменной хроматографией на DEAE-сефадексе А-25 в аммоний-ацетатном буфере в изократическом или градиентном режиме в интервале мольности буфера от 0,1 до 0,3 М, рН 6,7–7,7. Несколько характерных профилей элюций приведены на рис. 3.

Чистота конечных продуктов (I)–(XII) контролировалась ТСХ, аминокислотным анализом (гидролиз в 6 н. HCl и метансульфокислоте), высоковольтным электрофорезом при рН 1,9 и 6,5, одним циклом деградации по Эдману (для характеристики N-концевого аминокислотного остатка) и высокоэффективной ионообменной хроматографией на смоле DC-6A в условиях, отвечающих стандартному аминокислотному анализу (рис. 4). Ферментативный гидролиз DSIP (I) и его аналогов (II)–(V), (XI), (XII) лейцинаминопептидазой подтвердил их оптическую чистоту и отсутствие изомерных продуктов с β -связью аспарагиновой кислоты (табл. 1). Проводимые в настоящее время исследования спектров ЯМР высокого разрешения (300 МГц) [7] также свидетельствуют о гомогенности полученных продуктов.

Биологическое *in vivo* тестирование сомногенных свойств представляло достаточно сложную проблему. Имеющиеся в литературе данные, касающиеся гипногенного действия DSIP, крайне противоречивы. Так, в работах Монье и сотр. [4, 6, 16] и Полка и сотр. [17] сообщалось, что внутривенное введение DSIP в дозе 30 нмоль/кг кроликам [4, 6] и кошкам [17] и 30, 40 и 80 нмоль крысам [16] вызывает достоверное увеличение общего количества сна, главным образом за счет его медленноволновой фазы (δ -сон) у кроликов и крыс и REM-сна (Rapid eye movement) у кошек. В противоположность действию малых доз внутривенное введение большей дозы DSIP (300 нмоль/кг), по данным Полка и сотр. [17], не вызывало никакого эффекта. Почти одновременно были опубликованы работы Кармановой и сотр. [18, 19] и Медведева и сотр. [20], описывающие сильное наркозоподобное действие больших доз DSIP (до 20 нмоль) при центральном введении кошкам, белым крысам и собакам.

Однако наряду с этими сообщениями в печати появились работы, в которых попытки воспроизвести результаты Монье не привели к успеху. Так, в опытах Ковальсона и Цибульского [21] введение в дозе 6 нмоль

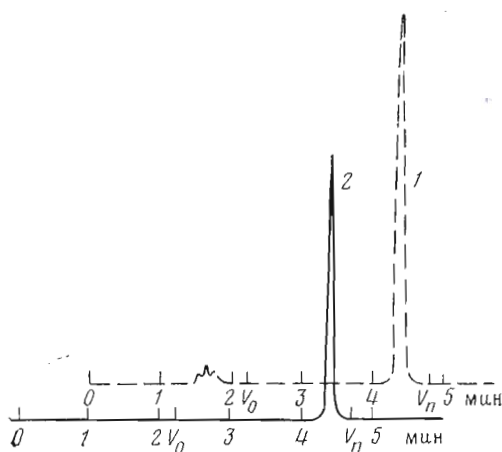


Рис. 2. Эксклюзионная хроматография защищенного DSIP (XIX) на силсорбе 600 в DMF [15] (колонка 0,8×25 см, эффективность 27 000 теор. тарелок, скорость 2 мл/мин, ввод 10 мкл, с 0,1). 1 — УФ-детектор, 280 нм; 2 — рефрактометрический детектор

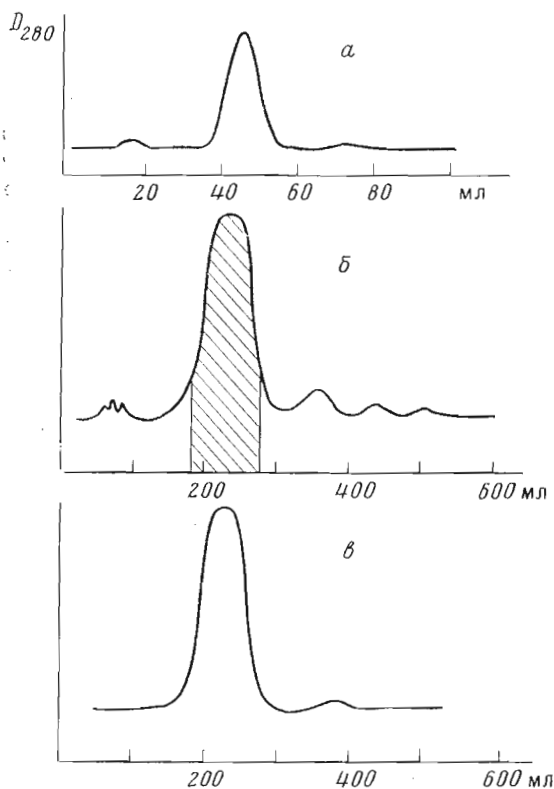


Рис. 3. Профиль элюции при хроматографии на DEAE-сефаделе А-25 в 0,3 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$: а — DSIP (I), полученного REMA-методом (колонка 1×10 см, нагрузка 6 мг); б — [Ava^{3,4}]DSIP² (VI) (колонка 2,5×10 см, нагрузка 0,2 г); в — рехроматография основной фракции рис. 3б (соответствует заштрихованной части пика)

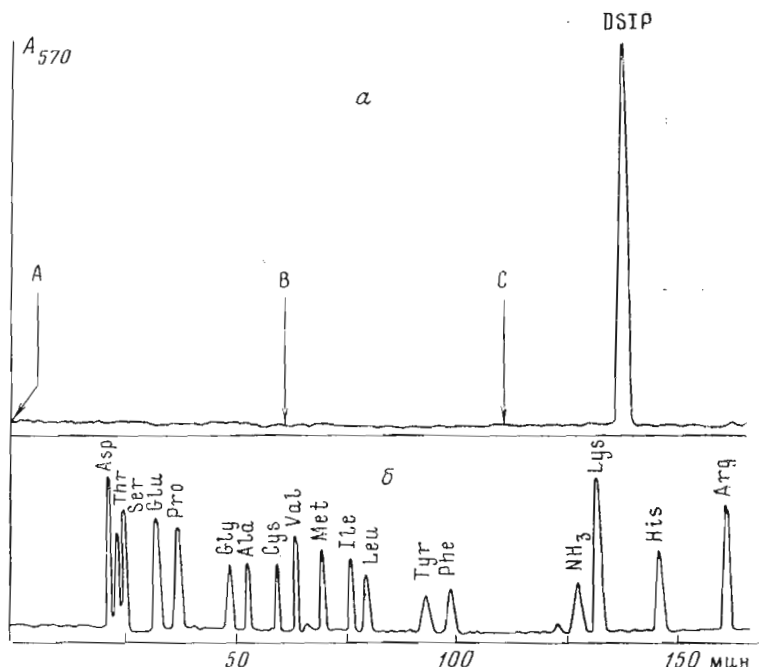


Рис. 4. Высокоэффективная ионообменная хроматография на колонке (0,8×30 см) со смолой DC-6A при элюции 0,2 н. цитратом натрия, pH 3,2 (A), с добавлением 0,35 н. NaCl (B, pH 4,25) и 1,35 н. NaCl (C, pH 5,8) DSIP (a) и стандартной смеси аминокислот (б)

внутрижелудочно и 30 нмоль внутривенно кроликам и крысам не давало достоверного увеличения сна. Сходные результаты были получены Тоблер и Борбели [22], исследовавших действие DSIP на двигательную активность крыс (доза 40–160 нмоль при внутрибрюшинном введении) и на сон (доза 7–24 нмоль при внутрижелудочковом введении). При этом ни уменьшения двигательной активности, ни увеличения сна не было обнаружено. Более того, авторы наблюдали даже некоторый активирующий эффект DSIP на крысах.

Таким образом, вопрос о сомногенном действии DSIP пока остается открытым и выяснение его истинной физиологической роли требует дальнейших исследований.

В поисках более простого *in vitro* теста для первичного скрининга биологического действия синтезированных нейропептидов мы обратились к электрофизиологическим исследованиям на гигантских нервных клетках моллюсков. Использование идентифицированных нейронов беспозвоночных в качестве тест-системы для изучения механизмов действия нейропептидов получает в последние годы все большее распространение в связи с методическими преимуществами эксперимента, определяемыми большими размерами нейронов [23–26]. При интерпретации данных в этих исследованиях учитывается, что молекулярные механизмы функционирования нервных клеток у беспозвоночных и позвоночных принципиально сходны. Например, у беспозвоночных показано наличие всех медиаторных и рецепторных систем, встречающихся в мозгу позвоночных, включая опитные рецепторы [27]. В серии работ Такеуши с соавт. [26] исследовано действие 90 различных аминокислот, ди-, три- и тетрапептидов на спонтанную активность двух идентифицированных нейронов африканской улитки и показана тормозящая активность некоторых пептидов в концентрации около 10^{-6} М. Гайнером и сотр. [23, 24] исследовано действие ряда нейропептидов на спонтанную активность гомологичных нейронов мол-

Аминокислотный анализ синтезированных пептидов *

Соединение	Gly			Ala			Asp			Ser			Glu				
	а	б	в	а	б	в	а	б	в	а	б	в	а	б	в	г	
																	г
(I)	2,98	2,90	3,00	2,03	4,96	2,08	2,00	0,95	4,01	4,07	1	0,96	1,03	4,07	1,04	1	1
(II)	2,94	3,02	2,97	1,95	1,97	2,01	2	1,03	0,96	4,02	1	0,96	0,95	0,94	1,02	1	1
(III)	2,03	1,94	2,03	1,98	2,06	2,07	2	1,05	0,98	1,03	1	0,96	0,95	0,98	1,02	1	1
(IV)	2,98	2,96	3,01	2,02	2,01	1,99	2	1,01	0,98	0,97	1	1,03	1,04	0,97	0,98	1	1
(V)	3,02	3,01	2,97	1,01	1,02	1,03	1	1,05	0,99	0,95	1	1,03	1,04	0,97	0,98	1	1
(VI)	4,03	0,95		2,06	1,98		2	1,02	1,04		1	0,95	0,96		0,98	1	1
(VII)	3,95	4,05		2,06	2,05		2	1,05	1,07		1	0,97	0,95		1,03	1	1
(VIII)	2,96	3,05		2,06	2,07		2	1,05	1,02		1	0,97	0,93		0,98	1	1
(IX)	2,07	1,98		3,07	2,96		3	1,06	1,08		1	0,98	0,93		1,05	1	1
(X)	2,03	1,94		3,09	2,91		3	1,06	0,95		1	1,01	1,05		0,95	1	1
(XI)	2,97	3,05	2,97	2,02	2,07	1,96	2	0,97	1,05	1,08	1	0,98	1,06	0,94	0,96	1	1
(XII)	2,98	2,96	3,05	2,05	1,98	1,97	2	0,98	1,05		1	1,07	0,98	0,91	1,03	1	1

Соединение	Glu-NH ₂			Trp			Tyr			Pro			Asn				
	а	б	в	а	б	в	а	б	в	а	б	в	а	б	в	г	
																	г
(I)					0,95	0,97	1		0,95	0,97							
(II)					0,94	0,96	1		0,96	1,02							
(III)					0,95	0,94	1		0,95	0,94							
(IV)					0,95	0,96	1		0,97	0,94							
(V)					0,97	0,96	1		0,97	0,98							
(VI)					0,96		1										
(VII)					0,98		1										
(VIII)					1,08		1										
(IX)					0,95		1										
(X)					1,06		1										
(XI)		1,05	1		1,08		1										
(XII)					1,06		1										
																	1,07

* а — HCl, б — метансульфокислота, в — лейцинамидопептидаза, г — теория.

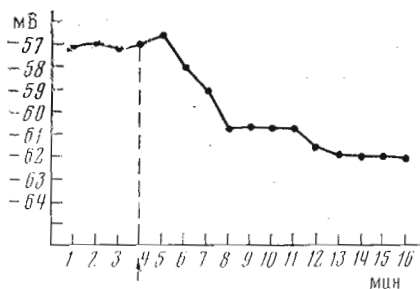


Рис. 5

Рис. 5. Влияние DSIP в концентрации 10^{-8} М на потенциал покоя нейрона RPa1. Момент введения отмечен стрелкой

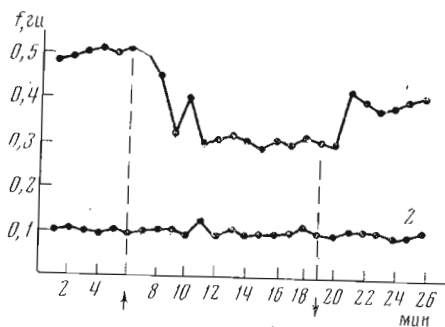


Рис. 6

Рис. 6. Действие DSIP (10^{-8} М) на частоту спонтанной импульсной активности (f) нейронов, RPa 6 (1) и V16 (2). Начало и конец воздействия отмечены стрелками

Рис. 7. Действие DSIP (1) и его аналогов [Glu(NH₂)]DSIP (2) и [Ava^{3,4}]DSIP (3) в концентрациях 10^{-7} М на частоту спонтанной импульсной активности нейрона V3. Начало воздействия отмечено стрелкой. Вертикальными отрезками обозначена ошибка среднего значения частоты импульсной активности за 5 мин, отложенного в каждом интервале

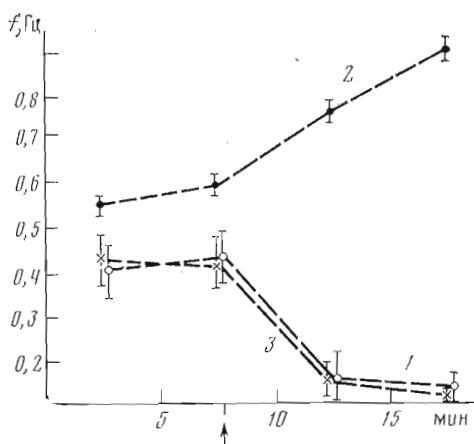


Рис. 7

люсков *Otala lactea* (клетка V11) и *Aplysia* (R15). Показана специфичность действия ряда пептидов.

Эффект DSIP и его аналогов на нейроны виноградной улитки оценивался по изменению основных показателей активности нейронов — частоты спонтанной импульсной активности и сдвигу потенциала покоя, регистрируемых внутриклеточными микроэлектродами по стандартной электрофизиологической методике [28].

Действие DSIP исследовалось на идентифицированных нейронах V3, V5, V7, V11, V12, V14, V16, RPa1, RPa5, RPa6, RPa8 и серотонинэргических нейронах LMC1 церебральных ганглиев улитки. Введение в омывающий нервную систему раствор Рингера DSIP в концентрации $5 \cdot 10^{-9}$ М вызывало уменьшение частоты спонтанной импульсной активности в среднем на 30–40% и гиперполяризационный сдвиг потенциала покоя на 1–4 мВ в нейронах V2, V3, V5, V7, RPa1, RPa5, RPa6, RPa8 и не оказывало эффекта на нейроны V12, V14, V16 и LMC1. Пептид (1) в концентрации 10^{-8} М вызывал тот же эффект более стабильно, в связи с чем эта концентрация была использована в большинстве экспериментов (рис. 5, 6). При дальнейшем повышении концентрации DSIP до 10^{-6} М эффект не изменялся.

Наибольший эффект наблюдался в клетках, содержащих гранулы нейросекрета. Известно, что такие нейроны могут в качестве нейросекрета выделять пептиды [25]. DSIP не действовал на гигантские нейроны LMC1 метациеребральных ганглиев, для которых доказано участие серотонинэргических механизмов.

Действие DSIP и его аналогов на нервные клетки виноградной улитки
Helix lucorum L

Соединение	Пороговая концентрация пептида, вызывающая гиперполяризацию и уменьшение частоты спонтанной импульсной активности нервных клеток, М	Соединение	Пороговая концентрация пептида, вызывающая гиперполяризацию и уменьшение частоты спонтанной импульсной активности нервных клеток, М
DSIP (I)	$5 \cdot 10^{-9}$	(VII)	$> 10^{-6}$
(II)	10^{-7}	(VIII)	$> 10^{-6}$
(III)	10^{-7}	(IX)	$> 10^{-6}$
(IV)	10^{-7}	(X)	$> 10^{-6}$
(V)	10^{-7}	(XI)	10^{-7}
(VI)	$5 \cdot 10^{-8}$	(XII)	$> 10^{-6}$

Действие аналогов (II)–(XII) изучалось на нейронах V3, V7, RPa5 и LMC1. Аналоги (II)–(V) вызывали те же эффекты, что и DSIP (уменьшение спонтанной импульсной активности в среднем на 30–40% и гиперполяризационный сдвиг потенциала покоя на 1–4 мВ в нейронах V3, V7 и RPa5) и не оказывали влияния на LMC1, но пороговые концентрации при этом были выше (табл. 2). Аналог (VI) действовал на те же нейроны, что и аналоги (II)–(V) в концентрации $0,5 \cdot 10^{-8}$ М, в то время как аналоги (VII)–(X) и (XII) были неактивны вплоть до концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ М. Аналог (XI) в концентрации $0,5 \cdot 10^{-8}$ М вызывал учащение спонтанной импульсной активности нейронов V3, V7, RPa5 на 50%, т. е. эффект, обратный DSIP (рис. 7), и не действовал на нейроны LMC1. Деполаризационный сдвиг потенциала покоя, вызываемый перфузией этого аналога, маскировался учатившейся импульсной активностью, в связи с чем оценить его количественно не удалось. Полученные данные свидетельствуют о высокой структурной специфичности нейротропного действия DSIP и его аналогов на активность нейронов изолированной нервной системы виноградной улитки.

Было также изучено действие DSIP на системы распада ацетилхолина, серотонина и катехоламинов в синапсах и митохондриях различных отделов мозга кролика [29]. Во всех случаях DSIP в концентрации 10^{-5} и 10^{-6} М вызывал значительную (в 2–4 раза) активацию моноаминоксидазы А (субстрат — серотонин), в то время как активность монооксидазы В (субстрат — нитрофенилэтиламин) и ацетилхолинэстеразы не изменялась. Можно предположить, что действие DSIP на нейроны улитки также объясняется его участием в регуляции ферментов обмена медиаторов.

Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты и производные фирм «Reanal» и «Serva», ряд производных был приготовлен по известным методикам [30, 31]. Аминокислотные анализы кислотных гидролизатов пептидов (6 н. HCl, 20 ч, 110°C) проводили на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Для определения триптофана в конечных продуктах гидролиз осуществляли в метансульфокислоте, содержащей 0,2% 3-(2-аминоэтил)индола (20 ч, 110°C). Ферментативный гидролиз свободных пептидов проводили лейцинаминопептидазой (Merck, ФРГ) по методике [13]. Для высоковольтного электрофореза использовали бумагу Whatman 3 MM (напряжение 5000 В, 30 мин, $\text{AsOH} - \text{HCOOH} - \text{H}_2\text{O}$, 6:1:50, pH 1,9, и 0,8 М пиридин-ацетатный буфер, pH 6,5). Температуры плавления (не исправлены) измерены в блоке Кофлера. Удельные вращения с точностью $\pm 1^{\circ}$ определены при 25°C в дециметровой кювете на спектрополяриметре «Perkin-Elmer 141» (США). Ионнообменную хроматографию проводили на DEAE-сефадексе А-25 (Pharmacia, Швеция) в аммоний-аце-

Объемные соотношения компонентов хроматографических систем

Растворитель	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Хлороформ	6	6	12	6	60	60											
Этилацетат	2	3	6	3			1	3	2	1	1	30					
Метанол		1	1	1	50	40											
Бутанол													4	30	30		16
Гексан								1	1	1	2	10					
Пиридин														12	24		10
Уксусная кислота				1								1	1	15	10		3
Вода													1	10	20	1	12
10% NH ₄ OH					5	1											
Ацетон																4	

татном буфере в изократическом или градиентном режимах в интервале молярности буфера от 0,1 до 0,3, pH 6,7–7,7 (колонка 2,5×10 см, скорость 30 мл/ч, нагрузка 0,2 г). В качестве детектирующего прибора использовали «Uvicord II» (ЛКВ, Швеция). Высокоэффективную ионообменную хроматографию проводили на смоле DC-6A (Durrum, США) (рис. 4), эксклюзионную хроматографию — на приборе фирмы «Waters» (США) (рис. 2), тонкослойную хроматографию — на пластинках с закрепленным слоем силикагеля фирмы «Merck» в хроматографических системах, приведенных в табл. 3. Физико-химические константы соединений даны в табл. 4.

Все используемые растворители предварительно перегоняли; растворители, применявшиеся при проведении реакций конденсации, абсолютировали обычным образом [36]. Для небольших пептидов (вплоть до пентапептидов) проводили элементный анализ, результаты которого удовлетворительно соответствовали теоретическим значениям.

Для тестирования на электрофизиологических моделях пептиды растворяли в растворе Рингера для холоднокровных непосредственно перед введением в микровашиючку объемом 10 мл с изолированной центральной нервной системой виноградной улитки [28]. Регистрировали активность идентифицированных нейронов париетальных и висцерального ганглиев V3, V5, V7, V11, V12, V14, V16, RPa1, RPa5, RPa6, RPa8 и гигантских метацеребральных нейронов LMC1. Стеклообразные микропипетки с диаметром кончика около 0,5 мкм, заполненные 2 М раствором цитрата калия, вводились в нейроны с помощью микроманипулятора под визуальным контролем. Микроэлектроды соединялись со входом катодного повторителя (MZ-4 фирмы «Nihon Kohden», Япония) с помощью неполяризующихся хлорсеребряных электродов и агарового мостика. Одновременно проводили регистрацию активности 3–4 нейронов. Уровень шумов при сопротивлении микроэлектродов 10–20 МОм не превышал 0,2 мВ, дрейф аппаратуры 1 мВ/ч. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Температура добавляемых растворов и омывающего центральную нервную систему раствора Рингера была одинакова. В качестве контроля в ряде экспериментов вводили 1 мл раствора Рингера, не вызвавшего изменений в активности нейронов ни в одном из опытов.

1. *Boc-Gly-Glu(OBzl)-OBzl* (XIII) (схема 1). К раствору 3,27 г (10,00 ммоль) H-Glu(OBzl)-OBzl в смеси 100 мл диоксиана и 5 мл DMF добавляли 2,62 г (10,00 ммоль) Boc-Gly-ONSu, перемешивали 20 ч при 20° С. Растворитель упаривали при 40° С, остаток растворяли в этилацетате, промывали 10% лимонной кислотой, 5% NaHCO₃, водой, высушивали над Na₂SO₄ и упаривали. Выход дипептида 4,36 г (90%).

2. *Boc-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl* (XIV). а) 4,84 г (10,00 ммоль) дипептида (XIII) растворяли в 50 мл CF₃COOH и выдерживали 1 ч при 20° С.

Константы сплестированных соединений

Соединение	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$	R_f (система по табл. 3)	Соединение	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$	R_f (система по табл. 3)
(I)		-16,2 (с 0,3, H ₂ O)	0,50(14) 0,32(15)	(XXXI)	117	-7,9 (с 1,0, MeOH)	0,40(11) 0,70(10)
(II)		-6,0 (с 0,2, H ₂ O)	0,30(13) 0,44(17)	(XXXII)	113	-11,9 (с 1,0, MeOH)	0,50(9) 0,30(10)
(III)		-20,0 (с 0,3, H ₂ O)	0,18(13) 0,35(17)	(XXXIII)	130	-24,0 (с 1,0, DMF)	0,70(7) 0,50(8)
(IV)		-33,3 (с 3,0, H ₂ O)	0,50(13) 0,40(4)	(XXXIV)	204	-18,0 (с 2,0, DMF)	0,80(4) 0,60(7)
(V)		-17,7 (с 3,0, H ₂ O)	0,40(3) 0,30(4)	(XXXV)	112	-9,0 (с 1,0, MeOH)	0,40(7) 0,50(2)
(VI)		-30,5 (с 0,3, H ₂ O)	0,65(16) 0,25(17)	(XXXVI)	136	-21,0 (с 1,0, DMF)	0,60(11) 0,80(7)
(VII)		-4,9 (с 5,2, H ₂ O)	0,69(16) 0,30(17)	(XXXVII)	202	-27,5 (с 2,0, DMF)	0,85(4) 0,50(3)
(VIII)		-20,0 (с 1,0, H ₂ O)	0,79(16) 0,22(17)	(XXXVIII)	-	-21,8 (с 1,0, MeOH)	0,83(5) 0,76(4)
(IX)		-6,0 (с 5,0, H ₂ O)	0,77(16) 0,36(17)	(XXXIX)	220	-4,9 (с 0,5, DMF)	0,60(5) 0,61(4)
(X)		-9,4 (с 0,3, H ₂ O)	0,62(16) 0,44(17)	(XL)	160	-13,1 (с 0,5, DMF)	0,81(5) 0,66(4)
(XI)		-15,1 (с 0,5, H ₂ O)	0,69(16) 0,23(17)	(XLI)**	152	-45,7 (с 0,5, DMF)	0,74(5) 0,47(13)
(XII)		-24,1 (с 0,3, H ₂ O)	0,80(16) 0,40(17)	(XLII)	128	-27,7 (с 0,5, DMF)	3,55(6) 0,44(4)
(XIII)		-6,6 (с 0,3, MeOH)	0,50(2) 0,78(7)	(XLIII)	209	-5,0 (с 0,5, DMF)	0,38(13) 0,35(15)
(XIV)	76	-10,5 (с 1,0, MeOH)	0,34(2) 0,60(12)	(XLIV)	162	+4,5 (с 1,0, MeOH)	0,57(13) 0,36(15)
(XV)	124	-9,7 (с 1,0, MeOH)	0,30(2) 0,30(2)	(XLV)	118	+9,0 (с 1,0, MeOH)	0,44(4) 0,59(5)
(XVI)	143	-18,6 (с 1,0, DMF)	0,30(12) 0,68(8)	(XLVI)	209	-32,0 (с 1,0, DMF)	0,42(5) 0,77(13)
(XVII)*	163	+3,2 (с 1,0, DMF)	0,53(13) 0,42(5)	(XLVII)**	125	+43,1 (с 0,5, MeOH)	0,68(5) 0,77(13)

Соединение	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$	R_f (система по табл. 3)	Соединение	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$	R_f (система по табл. 3)
(XVIII)	209	-8,6 (с 4,0, DMF)	0,59 (13) 0,82 (5)	(XLVIII)	473	+12,7 (с 0,5, MeOH)	0,68 (5) 0,71 (13)
(XIX)	181	-9,7 (с 4,0, DMF)	0,60 (4) 0,65 (5)	(XLIX)	214	-13,4 (с 0,5, DMF)	0,80 (5)
(XX)	61	-10,2 (с 3,0, MeOH)	0,70 (10) 0,71 (2)	(L)	210	-10,2 (с 0,5, DMF)	0,75 (13) 0,81 (4)
(XXI)	88	-7,3 (с 0,3, MeOH)	0,72 (9) 0,50 (3)	(LI)	193	-11,5 (с 0,5, DMF)	0,71 (6) 0,68 (4)
(XXII)	132	-18,5 (с 0,3, MeOH)	0,37 (9) 0,40 (2)	(LII) *	126	-18,8 (с 0,5, MeOH)	0,37 (9) 0,64 (5)
(XXIII)	105	-32,0 (с 0,3, MeOH)	0,30 (9) 0,50 (2)	(LIII)	210	-12,4 (с 0,5, MeOH)	0,72 (13) 0,56 (5)
(XXIV)	174	-9,6 (с 0,5, DMF)	0,72 (5) 0,79 (4)	(LIV)	200	-9,8 (с 0,5, DMF)	0,77 (13) 0,70 (6)
(XXV)	66	-7,7 (с 0,5, MeOH)	0,37 (11) 0,50 (10)	(LV)	112	-4,7 (с 0,5, MeOH)	0,78 (4) 0,82 (6)
(XXVI)	126	-6,0 (с 0,3, MeOH)	0,69 (10) 0,80 (1)	(LVI)	110	-10,7 (с 0,5, MeOH)	0,37 (2) 0,80 (6)
(XXVII)	98	-17,4 (с 0,3, MeOH)	0,55 (1) 0,50 (9)	(LVII)	140	-10,6 (с 0,5, MeOH)	0,42 (2) 0,76 (6)
(XXVIII)	125	-27,4 (с 0,4, MeOH)	0,94 (9) 0,69 (13)	(LVIII)	72	-13,2 (с 0,5, DMF)	0,25 (2) 0,82 (6)
(XXIX)	147	-16,4 (с 0,4, DMF)	0,35 (9) 0,57 (2)	(LIX)	212	-6,7 (с 0,5, DMF)	0,74 (5) 0,64 (4)
(XXX)	175	-6,6 (с 0,5, DMF)	0,63 (5) 0,51 (4)	(LX)	157	-11,0 (с 0,5, DMF)	0,36 (9) 0,36 (9)
				(LXI)	243	-6,6 (с 0,5, DMF)	0,38 (2) 0,47 (4) 0,72 (5)

* [32]: т. пл. 162—163° С, $[\alpha]_D^{25}$ -14,2° (с 1,0; дихлоруксусная кислота).** [33, 34]: т. пл. 154—155° С [33], 150—151° С [34]; $[\alpha]_D^{23}$ -60,4° (с 2,5; EtOH) [34].** [35]: т. пл. 125—127° С, $[\alpha]_D^{25}$ +16,0° (с 2,7, EtOH).*** [34]: т. пл. 127—128° С, $[\alpha]_D^{25}$ -17,0° (с 2,6, EtOH).

CF_3COOH упаривали в вакууме при 40°C и трифторацетат дипептида (XIIIa) высушивали в вакууме над NaOH . Выход количественный.

б) К раствору 2,95 г (10,00 ммоль) Voc-Ser(Bzl)-OH в смеси 100 мл диоксана и 10 мл DMF при охлаждении до 0°C и перемешивании добавляли 1,48 г (11,00) HOBT и 2,26 г (11,00 ммоль) DCC . Через 5 мин к реакционной смеси приливали раствор 4,98 г (10,00 ммоль) трифторацетата (XIIIa) в 20 мл диоксана и 1,10 мл (10,00 ммоль) N-метилморфолина . Перемешивали 3 ч при 0°C и 20 ч при 20°C . Дидиклогексилмочевину отфильтровывали и растворитель удаляли упариванием. Остаток растворяли в этилацетате и оставляли на 12 ч при 4°C . Повторно отфильтровывали остатки мочевины, раствор промывали 10% лимонной кислотой, водой и высаживали над Na_2SO_4 . Этилацетат частично упаривали и пептид (XIV) высаживали эфиром, после чего кристаллизовали из смеси этилацетат — эфир. Выход 5,42 г (82%).

3. *Voc-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XV)*. а) Из 3,31 г (5,00 ммоль) пептида (XIV) в условиях опыта 2а получали трифторацетат (XIVa) с количественным выходом.

б) Из 0,95 г (5,00 ммоль) Voc-Ala-OH в смеси 50 мл диоксана и 5 мл DMF, 0,75 г (5,50 ммоль) HOBT , 1,13 г (5,50 ммоль) DCC , 3,33 г (5,00 ммоль) трифторацетата (XIVa) и 0,55 мл (5,00 ммоль) N-метилморфолина в условиях опыта 2б получали тетрапептид (XV) (перекристаллизация из этилацетата). Выход 2,90 г (78%).

4. *Voc-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XVI)*. а) Раствор 2,60 г (3,50 ммоль) пептида (XV) в 15 мл 50% CF_3COOH в CH_2Cl_2 выдерживали 1 ч при 20°C , CF_3COOH упаривали, к остатку добавляли 20 мл эфира, осадок трифторацетата тетрапептида (XVa) отфильтровывали и сушили в вакууме над NaOH . Выход 2,54 г (95%).

б) Из 2,54 г (3,36 ммоль) трифторацетата (XVa) в смеси 25 мл диоксана, 5 мл DMF, 0,37 мл (3,36 ммоль) N-метилморфолина и 1,47 г (3,36 ммоль) $\text{Voc-Asp(OBzl)-ONSu}$ в условиях опыта 1 получали пептид (XVI) и кристаллизовали его из этилацетата. Выход 2,50 г (79%). Аминокислотный анализ: Gly 0,95 (1); Ala 1,06 (1); Asp 1,03 (1); Ser 0,93 (1); Glu 1,02 (1).

5. *Z-Ala-Gly-Gly-OH (XVII)*. К раствору 1,45 г (11,00 ммоль) H-Gly-Gly-OH в 25 мл воды добавляли 0,44 г (11,00 ммоль) NaOH . Через 15 мин при перемешивании и охлаждении до 0°C постепенно приливали раствор 3,20 г (10,00 ммоль) Z-Ala-ONSu в смеси 10 мл диоксана и 5 мл DMF и перемешивали 2 ч при 0°C и 20 ч при 20°C . Далее растворитель упаривали, к остатку добавляли раствор 0,2 н. H_2SO_4 до кислой реакции, после чего полученный пептид (XVII) экстрагировали этилацетатом дважды. Объединенные этилацетатные вытяжки промывали насыщенным раствором NaCl до нейтральной реакции и сушили над Na_2SO_4 . Пептид (XVII) кристаллизовали из этилацетата. Выход 3,26 г (94%).

6. *Z-Trp-Ala-Gly-Gly-OH (XVIII)*. а) 1,68 г (5,00 ммоль) Z-Ala-Gly-Gly-OH (XVII) гидрировали 3 ч в 25 мл MeOH , содержащего 0,3 мл ледяной CH_3COOH над Pd-чернью . Затем к реакционной смеси приливали 10 мл воды, катализатор отфильтровывали и растворитель упаривали. Выход ацетата трипептида (XVIIIa) количественный.

б) Из 1,32 г (5,00 ммоль) ацетата (XVIIIa) в 50 мл воды, 1,40 г (10,00 ммоль) NaHCO_3 и 2,18 г (5,00 ммоль) Z-Trp-ONSu в 20 мл DMF в условиях опыта 5 получали пептид (XVIII) с выходом 2,22 г (85%). Аминокислотный анализ: Gly 2,05 (2); Ala 1,02 (1).

7. *Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XIX)*. а) Из 1,00 г (1,05 ммоль) пептида (XVI) в условиях опыта 4а получали трифторацетат (XVIa) с выходом 0,95 г (95%).

б) К раствору 0,60 г (1,15 ммоль) пептида (XVIII) в 20 мл DMF добавляли 0,13 мл (1,15 ммоль) N-метилморфолина , смесь охлаждали до -15°C и приливали 0,15 мл (1,10 ммоль) изобутилхлорформиата. Через

3 мин к смеси добавляли охлажденный до -15°C раствор 0,95 г (1,00 ммоль) трифторацетата (XVIa) в 20 мл DMF и 0,11 мл (1,00 ммоль) N-метилморфолина. Перемешивание продолжали 3 ч при -15°C и 1 ч при 0°C . К реакционной смеси приливали насыщенный раствор NaHCO_3 , выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, бутанолом, этилацетатом и сушили в вакууме. Выход 1,06 г (73%). Аминокислотный анализ: Gly 3,02 (3); Ala 2,06 (2); Asp 0,97 (1); Ser 0,98 (1); Glu 0,95 (1).

8. *Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu* (I). 0,50 г (0,34 ммоль) пептида (XIX) гидрировали 4 ч над Pd-чернью в 50 мл DMF, содержащего 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, к реакционной смеси приливали 20 мл воды, катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали при 30°C в вакууме, остаток растворяли в воде и раствор лиофилизировали. Сырой продукт (0,3 г) подвергали ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефадексом А-25, используя 0,3М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 6,7. Выход 0,2 г (83%).

9. *Voc-Gly-Tyr(Bzl)-OBzl* (XX). Из 6,74 г (16,00 ммоль) ацетата H-Tyr(Bzl)-OBzl [37] в смеси 30 мл диоксана и 10 мл DMF, 1,76 мл (16,00 ммоль) N-метилморфолина и 4,24 г (16,16 ммоль) Voc-Gly-ONSu в условиях опыта 1 получали дипептид (XX), который кристаллизовали из смеси эфира и гексана. Выход 7,20 г (87%).

10. *Voc-Ser(Bzl)-Gly-Tyr(Bzl)-OBzl* (XXI). а) К раствору 5,18 г (10,00 ммоль) пептида (XX) в 20 мл ледяной CH_3COOH приливали 4,26 мл (30,00 ммоль) эфирата трифторида бора, выдерживали 30 мин при 4°C , приливали 10 мл 10% раствора CH_3COONa и продукт (XXa) экстрагировали из образовавшейся эмульсии этилацетатом. Экстракт сушили над Na_2SO_4 и этилацетат упаривали. Ацетат (XXa) кристаллизовали из эфира. Выход 4,26 г (89%).

б) Из 4,26 г (8,90 ммоль) ацетата (XXa) в смеси 25 мл диоксана и 10 мл DMF, 0,98 мл (8,90 ммоль) N-метилморфолина и 3,84 г (9,79 ммоль) Voc-Ser(Bzl)-ONSu в условиях опыта 1 получали трипептид (XXI), который кристаллизовали из смеси эфира и гексана. Выход 6,50 г (93%).

11. *Voc-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Tyr(Bzl)-OBzl* (XXII). а) Из 6,00 г (8,62 ммоль) пептида (XXI) в условиях опыта 10a получали ацетат (XXIIa) с выходом 5,20 г (92%).

б) Из 5,20 г (7,93 ммоль) ацетата (XXIIa) в смеси 25 мл диоксана и 10 мл DMF, 0,91 мл (7,93 ммоль) N-метилморфолина и 2,41 г (8,72 ммоль) Voc-Ala-ONSu в условиях опыта 1 получали тетрапептид (XXII), который кристаллизовали из эфира. Выход 6,01 г (99%).

12. *Voc-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Tyr(Bzl)-OBzl* (XXIII). а) Из 5,50 г (7,17 ммоль) пептида (XXII) в условиях опыта 10a (для экстракции использовали смесь 50 мл бутанола и 100 мл этилацетата) получали кристаллизацией из смеси этилацетата и эфира ацетат (XXIIIa) с выходом 5,30 г (98%).

б) Из 5,30 г (7,02 ммоль) ацетата (XXIIIa), 0,77 мл (7,02 ммоль) N-метилморфолина и 3,39 г (7,02 ммоль) Voc-Asp(OBzl)-ONSu в условиях опыта 1 получали пентапептид (XXIII), который кристаллизовали из этилацетата. Выход 6,05 г (89%). Аминокислотный анализ: Gly 0,98 (1); Ala 1,06 (1); Asp 0,96 (1); Ser 0,98 (1); Tyr 0,95 (1).

13. *Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala - Ser(Bzl)-Gly - Tyr(Bzl)-OBzl* (XXIV). а) 1,20 г (1,24 ммоль) пептида (XXIII) обрабатывали эфиратом трифторида бора аналогично опыту 10a. Выпавший после добавления раствора CH_3COONa осадок промыли водой и высушили над P_2O_5 . Выход ацетата (XXIIIa) 0,95 г (83%).

б) Из 0,57 г (1,10 ммоль) Z-Trp-Ala-Gly-Gly (XVIII), 0,12 мл (1,10 ммоль) N-метилморфолина, 0,14 мл (1,05 ммоль) изобутилхлорформата, 0,93 г (1,00 ммоль) ацетата (XXIIIa) и 0,11 мл (1,00 ммоль) N-метилморфолина по методике 7б получили нонапептид (XXIV). Выход 0,94 г (68%). Аминокислотный анализ: Gly 3,03 (3); Ala 2,02 (2); Asp 0,95 (1); Ser 0,98 (1); Tyr 0,97 (1).

14. *Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Tyr* (II). 0,5 г (0,36 ммоль) нонапептида (XXIV) гидрировали в течение 12 ч и обрабатывали в условиях опыта 8. Сырой продукт (0,3 г) подвергали ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефадексом А-25 в градиентном режиме в интервале 0,1–0,2 М AcONH₄, pH 7,7. Выход 0,07 г (22%).

15. *Вос-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl* (XXV). К раствору 6,54 г (20,00 ммоль) Н-Glu(OBzl)-OBzl в 100 мл этилацетата добавляли 9,85 г (20,00 ммоль) Вос-Tyr(Bzl)-ONp, 2,70 г (20,00 ммоль) НОВТ и перемешивали 20 ч при 20° С. Реакционную смесь промывали 10% лимонной кислотой, 1% NH₄OH, водой, высушивали над Na₂SO₄, упаривали и остаток кристаллизовали из эфира при добавлении гексана. Дипептид (XXV) перекристаллизовывали из эфира. Выход 9,63 г (71%).

16. *Вос-Tyr(BzlCl₂)-Glu(OBzl)-OBzl* (XXVI). К раствору 3,27 г (10,00 ммоль) Н-Glu(OBzl)-OBzl в 50 мл этилацетата добавляли 5,37 г (10,00 ммоль) Вос-Tyr(BzlCl₂)-ONSu, перемешивали 20 ч при 20° С и обрабатывали согласно опыту 1. Дипептид (XXVI) кристаллизовали из эфира. Выход 6,9 г (88%).

17. *Вос-Tyr-Glu-OH* (XXVIa). 0,78 г (1,00 ммоль) пептида (XXVI) гидрировали 20 ч в 25 мл DMF над Pd-чернью. Катализатор отфильтровывали, DMF упаривали досуха и остаток обрабатывали эфиром. В результате была получена сложная смесь продуктов.

18. *Вос-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl* (XXVII). а) Из 6,8 г (10,00 ммоль) пептида (XXV) в условиях опыта 10а получали ацетат (XXVa) с выходом 5,45 г (85%).

б) Из 5,45 г (8,51 ммоль) ацетата (XXVa) в 50 мл этилацетата, 0,94 мл (8,51 моль) N-метилморфолина и 3,67 г (9,36 ммоль) Вос-Ser(Bzl)-ONSu в условиях опыта 1 получали трипептид (XXVII), который кристаллизовали из смеси этилацетата и эфира, а затем перекристаллизовывали из той же смеси. Выход 5,23 г (61%).

19. *Вос-Ala-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl* (XXVIII). а) Из 4,29 г (5,00 ммоль) Вос-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl пептида (XXVII) в условиях опыта 10а получали ацетат трипептида (XXVIIa) с выходом 3,31 г (79%).

б) Из 3,31 г (4,00 ммоль) ацетата (XXVIIa) в смеси 50 мл этилацетата и 5 мл DMF, 0,44 мл (4,00 ммоль) N-метилморфолина и 1,22 г (4,40 ммоль) Вос-Ala-ONSu в 25 мл этилацетата в условиях опыта 1 получали тетрапептид (XXVIII), который переосаждали из этилацетата эфиром. Выход 2,85 г (71%).

20. *Вос-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl* (XXIX). а) Из 4,65 г (5,00 ммоль) пептида (XXVIII) в условиях опыта 10а получали ацетат тетрапептида (XXVIIIa) с выходом 3,60 г (81%).

б) Из 3,60 г (4,05 ммоль) ацетата (XXVIIIa) в смеси 60 мл этилацетата и 10 мл DMF, 0,45 мл (4,05 ммоль) N-метилморфолина и 1,95 г (4,45 ммоль) Вос-Asp(OBzl)-ONSu в условиях опыта 1 получали пентапептид (XXIX), который кристаллизовали из смеси этилацетат–эфир. Выход 3,10 г (67%). Аминокислотный анализ: Ala 1,06 (1); Asp 0,95 (1); Ser 0,98 (1); Glu 1,02 (1); Tyr 0,97 (1).

21. *Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Glu(OBzl)-OBzl* (XXX). а) Из 2,84 г (2,50 ммоль) пептида (XXIX) в условиях опыта 10а получали ацетат пентапептида (XXIXa), при этом экстракцию проводили бутанолом и продукт кристаллизовали из этилацетата. Выход 2,20 г (80%).

б) Из 1,15 г (2,20 ммоль) тетрапептида (XVIII), 0,24 мл (2,20 ммоль) N-метилморфолина, 0,29 мл (2,10 ммоль) изобутилхлорформата, 2,01 г (2,00 ммоль) ацетата (XXIXa) и 0,22 мл (2,00 ммоль) N-метилморфолина по методике 7б получали 2,0 г (65%) нонапептида (XXX). Аминокислотный анализ: Gly 2,05 (2); Ala 1,98 (2); Asp 0,96 (1); Ser 0,97 (1); Glu 1,03 (1); Tyr 0,96 (1).

22. *Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Tyr-Glu (III)*. 1,0 г (1,05 ммоль) нонапептида (XXX) гидрировали 10 ч и обрабатывали в условиях опыта 8. Сырой продукт (0,85 г) подвергали ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефадексом А-25 в 0,3 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 6,7.

23. *Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XXXI)*. К раствору 9,97 г (20,00 ммоль) трифторацетата (XIIIa) в 150 мл этилацетата добавляли 0,22 мл (20,00 ммоль) N-метилморфолина, 9,85 г (20,00 ммоль) Boc-Tyr(Bzl)-ONp и 2,70 г (20,00 ммоль) НОВТ. Перемешивали 20 ч при 20° С, после чего реакцию смесь обрабатывали аналогично опыту 15. Полученный трипептид (XXXI) кристаллизовали из эфира и перекристаллизовывали из этилацетата. Выход 9,60 г (65%).

24. *Boc-Ala-Tyr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XXXII)*. 6,77 г (9,80 ммоль) ацетата (XXXIa), полученного в условиях опыта 10a с выходом 98%, растворяли в 100 мл этилацетата, приливали 1,07 мл (9,80 ммоль) N-метилморфолина и раствор 2,80 г (9,80 ммоль) Boc-Ala-ONSu в этилацетате. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 20° С и обрабатывали как в опыте 1. Тетрапептид (XXXII) перекристаллизовывали дважды из этилацетата. Выход 3,23 г (40%).

25. *Boc-Asp(OBzl)-Ala-Tyr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XXXIII)* получали из 0,77 г (1,00 ммоль) ацетата (XXXIIa) в 20 мл диоксана (получен из пептида (XXXII) в условиях опыта 10a с выходом 99%), 0,11 мл (1,00 ммоль) N-метилморфолина, 0,42 г (1,00 ммоль) Boc-Asp(OBzl)-ONSu в условиях опыта 1 (кристаллизация из смеси этилацетат — гексан). Выход 0,71 г (70%). Аминокислотный анализ: Gly 1,02 (1); Ala 0,95 (1); Asp 1,02 (1); Glu 1,03 (1); Tyr 0,98 (1).

26. *Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Tyr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XXXIV)* выделяли в условиях опыта 7б из 0,58 г (1,10 ммоль) пептида (XVIII), 0,12 мл (1,10 ммоль) N-метилморфолина, 0,15 мл (1,05 ммоль) изобутилхлорформиата, 0,97 г (1,00 ммоль) ацетата (XXXIIIa), полученного аналогично ацетату (XXa) с выходом 97%, и 0,11 мл (1,00 ммоль) N-метилморфолина. Выход 1,09 г (75%). Аминокислотный анализ: Gly 3,03 (3); Ala 1,96 (2); Asp 1,04 (1); Glu 0,95 (1); Tyr 0,94 (1).

27. *Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Tyr-Gly-Glu (IV)*. 1,44 г (1,00 ммоль) нонапептида (XXXIV) гидрировали 10 ч и обрабатывали в условиях опыта 8. Сырой продукт (1,4 г) подвергали ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефадексом А-25 в 0,3 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 6,7. Выход 0,65 г (70%).

28. *Boc-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XXXV)*. К раствору 13,51 г (20,00 ммоль) трифторацетата (XIVa) в этилацетате приливали 2,20 мл (20,00 ммоль) N-метилморфолина и при перемешивании добавляли 9,85 г (20,00 ммоль) Boc-Tyr(Bzl)-ONp и 2,70 г (20,00 ммоль) НОВТ. Полученный в условиях опыта 15 тетрапептид (XXXV) перекристаллизовывали из смеси этилацетата с гексаном. Выход 13,90 г (76%).

29. *Boc-Asp(OBzl)-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XXXVI)* получали из 0,87 г (1,00 ммоль) ацетата (XXXVa) в 20 мл диоксана (получен из пептида (XXXV) по методике 10a с выходом 98%), 0,11 мл (1,00 ммоль) N-метилморфолина и 0,42 г (1,00 ммоль) Boc-Asp(OBzl)-ONSu в условиях опыта 1. Выход 0,84 г (75%). Кристаллизация из этилацетата. Аминокислотный анализ: Gly 1,06 (1); Asp 1,02 (1); Ser 0,98 (1); Glu 1,02 (1); Tyr 0,97 (1).

30. *Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Tyr(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XXXVII)* получали из 0,58 г (1,10 ммоль) тетрапептида (XVIII), 0,12 мл (1,10 ммоль) N-метилморфолина, 0,15 мл (1,05 ммоль) изобутилхлорформиата, 1,08 г (1,00 ммоль) ацетата (XXXVIa), полученного в условиях опыта 10a с выходом 95%, и 0,11 мл (1,00 ммоль) N-метилморфолина по методике 7б. Выход 0,86 г (60%). Аминокислотный анализ: Gly 2,93 (3); Ala 1,06 (1); Asp 0,98 (1); Glu 0,97 (1); Ser 0,96 (1); Tyr 1,02 (1).

31. *Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Tyr-Ser-Gly-Glu (V)*. 1,43 г (1,00 ммоль) пеп-

тида (XXXVII) гидрировали 8 ч и выделяли в условиях опыта 8. Сырой продукт (0,70 г) хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом А-25 в 0,3 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Выход 0,54 г (77%).

32. *Woc-Ala-Ava-OH* (XXXVIII). К раствору 1,80 г (15,38 ммоль) δ -аминовалериановой кислоты в 50 мл воды при непрерывном перемешивании добавляли 1,38 г (15,38 ммоль) KHCO_3 , через 5 мин к реакционной смеси порциями приливали раствор 4,25 г (15,38 ммоль) *Woc-Ala-ONSu* в 50 мл диоксана. Перемешивали 20 ч при 20° С, диоксан упаривали, водный раствор подкисляли 0,2 н. H_2SO_4 до pH 2,3 и пептид (XXXVIII) экстрагировали из воды этилацетатом (3×50 мл). Объединенные этилацетатные вытяжки промывали водой, высушивали над Na_2SO_4 и упаривали. Выход (масло) 4,20 г (95%).

33. *Z-Trp-Ala-Ava-OH* (XXXIX). а) Из 1,44 г (5,00 ммоль) дипептида (XXXVIII) в условиях опыта 2а получали трифторацетат (XXXVIIIa) с выходом 1,48 г (98%).

б) К раствору 1,48 г (4,90 ммоль) ацетата (XXXVIIIa) в 50 мл воды при перемешивании добавляли 0,54 мл (4,30 ммоль) N-метилморфолина и раствор 2,13 г (4,90 ммоль) *Z-Trp-ONSu* в 50 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 20° С, диоксан упаривали, водный слой подкисляли 0,2 н. H_2SO_4 до pH 3 и пептид экстрагировали этилацетатом (2×150 мл), этилацетатные вытяжки промывали водой, сушили над Na_2SO_4 и упаривали до 50 мл. Трипептид (XXXIX) кристаллизовали из этилацетата. Выход 2,3 г (92%). Аминокислотный анализ: Ala 1,01 (1); Ava 0,97 (1).

34. *Z-Trp-Ala-Ava - Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl* (XL) получали из 0,51 мг (1,00 ммоль) трипептида (XXXIX), 0,11 мл (1,00 ммоль) N-метилморфолина, 0,130 мл (0,95 ммоль) изобутилхлорформата, 0,87 г (0,90 ммоль) трифторацетата (XVIa) и 0,10 мл (0,90 ммоль) N-метилморфолина в условиях опыта 7б. Выход 0,75 г (92%). Аминокислотный анализ: Gly 0,97 (1); Ala 1,02 (1); Asp 1,03 (1); Ser 0,98 (1); Glu 1,01 (1); Ava 1,03 (1).

35. *Trp-Ala-Ava-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu* (VI). 1,34 г (1,00 ммоль) октапептида (XL) гидрировали 8 ч и выделяли в условиях опыта 8. Сырой продукт (0,80 г) хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом в 0,3 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 6.7. Выход 0,47 г (56%).

36. *Z-Gly-Pro-OH* (XLI) (схема 2). 3,0 г (26,00 ммоль) N-Pro-OH растворяли в 20 мл H_2O , добавляли 2,18 г (26,00 ммоль) NaHCO_3 и при перемешивании и охлаждении до 0° С приливали раствор 6,36 г (26,00 ммоль) *Z-Gly-ONp* и 3,51 г (26,00 ммоль) НОВТ в 50 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 20° С, после чего диоксан и воду упаривали. Остаток растворяли в 1% NH_4OH и нитрофенол экстрагировали (2×50 мл) этилацетатом. Затем водный слой подкисляли 10% лимонной кислотой и пептид (XLI) экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный экстракт промывали водой, сушили над Na_2SO_4 и пептид (XLI) кристаллизовали из смеси этилацетат — эфир. Выход 5,0 г (63%).

37. *Z-Gly-Pro-ONSu* (XLIa). 1,70 г (5,50 ммоль) пептида (XLI) растворяли в смеси 100 мл этилацетата и 5 мл DMF, охлаждали до 0° С и при перемешивании добавляли 1,24 г (6,05 ммоль) DCC и 0,70 г (6,50 ммоль) N-оксисукцинимид. Перемешивали 3 ч при 0° С и 20 ч при 20° С. Отфильтровывали дициклогексилмочевину и кристаллизовали из этилацетата. Выход 2,50 г (61%).

38. *Z-Gly-Pro-Trp-Ala-Gly-Gly-OH* (XLII). а) 2,30 г (4,40 ммоль) тетрапептида (XVIII) гидрировали в условиях опыта 6а и ацетат (XVIIIa) лиофилизировали. Выход количественный.

б) 2,0 г (4,40 ммоль) ацетата (XVIIIa) растворяли в 100 мл воды и добавляли 0,97 мл (8,80 ммоль) N-метилморфолина, к смеси приливали раствор 1,95 г (4,84 ммоль) активированного эфира (XLIa) в 50 мл DMF. Перемешивали 20 ч при 20° С. Растворители упаривали, остаток раство-

ряли в этилацетате и промывали 10% лимонной кислотой, водой, сушили над Na_2SO_4 и пептид (XLII) кристаллизовали из этилацетата. Выход 2,30 г (77%). Аминокислотный анализ: Gly 3,03 (3); Ala 1,01 (1); Pro 0,97 (1).

39. *Z - Gly-Pro-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XLIII)* получали из 1,03 г (1,51 ммоль) гексапептида (XLII), 0,17 мл (1,51 ммоль) *N*-метилморфолина, 0,19 мл изобутилхлорформата, 1,30 г (1,36 ммоль) трифторацетата (XVIa) и 0,15 мл (1,36 ммоль) *N*-метилморфолина по методике 7б. Выход 2,0 г (96%). Аминокислотный анализ: Gly 3,98 (4); Ala 2,03 (2); Asp 1,02 (1); Ser 0,97 (1); Glu 0,98 (1); Pro 1,02 (1).

40. *H-Gly-Pro-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser - Gly - Glu (VII)*. 1,0 г (0,66 ммоль) пептида (XLIII) гидрировали 20 ч и обрабатывали в условиях опыта 8. Сырой продукт (0,8 г) хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом А-25 в 0,3 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 6,7. Выход 0,60 г (91%).

41. *Z-D-Ala-Gly-Gly-OH (XLIV)* (схема 1). Из 1,45 г (11,00 ммоль) *H-Gly-Gly-OH*, 0,44 г (11,00 ммоль) NaOH и 3,20 г (10,00 ммоль) *Z-D-Ala-ONSu* в условиях опыта 5 получали с выходом 2,76 г (80%) трипептид (XLIV) (пептид высаживали эфиром из этилацетата).

42. *Z-Trp-D-Ala-Gly-Gly-OH (XLV)*. а) 1,38 г (4,00 ммоль) трипептида (XLIV) гидрировали в условиях опыта 6а. Выход ацетата трипептида (XLIVa) количественный.

б) Из 1,09 г (4,00 ммоль) ацетата (XLIVa), 0,67 г (8,00 ммоль) NaHCO_3 и 1,81 г (4,00 ммоль) *Z-Trp-ONSu* в условиях опыта 6б получали пептид (XLV). Выход 1,65 г (75%). Аминокислотный анализ: Gly 2,01 (2); Ala 0,99 (1).

43. *Z - Trp - D-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (XLVI)* получали из 0,60 г (1,15 ммоль) пептида (XLV), 0,13 мл (1,15 ммоль) *N*-метилморфолина, 0,15 мл (1,10 ммоль) изобутилхлорформата, 0,95 г (1,00 ммоль) трифторацетата (XVIa) и 0,11 мл (1,00 ммоль) *N*-метилморфолина по методике 7б. Выход 1,2 г (79%). Аминокислотный анализ: Gly 3,07 (3); Ala 1,98 (2); Asp 0,98 (1); Ser 0,99 (1); Glu 1,02 (1).

44. *Trp-D-Ala-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu (VIII)*. 1,0 г (0,68 ммоль) пептида (XLVI) гидрировали 20 ч в условиях опыта 8. Сырой продукт (0,7 г) хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом А-25 в 0,3 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 6,7. Выход 0,20 г (35%).

45. *Z-D-Ala-Gly-OH (XLVII)* (схема 3) получали из 1,47 г (19,60 ммоль) *H-Gly-OH*, 0,70 г (19,60 ммоль) NaOH и 6,28 г (19,60 ммоль) *Z-D-Ala-ONSu* в условиях опыта 5. Выход 4,20 г (76%).

46. *Z-Ala-D-Ala-Gly-OH (XLVIII)*. а) Из 4,20 г (15,00 ммоль) дипептида (XLII) в условиях опыта 6а получали ацетат (XLVIIa) с количественным выходом.

б) Из 3,09 г (15,00 ммоль) ацетата (XLVIIa) в 50 мл H_2O , 3,22 г (30,00 ммоль) NaHCO_3 , 4,80 г (15,00 ммоль) *Z-Ala-ONSu* в 20 мл DMF в условиях опыта 5 получали пептид (XLVIII). Выход 3,50 г (66%).

47. *Z-Trp-Ala-D-Ala-Gly-OH (XLIX)*. а) Из 1,05 г (3,00 ммоль) трипептида (XLVIII) в условиях опыта 6а получали ацетат трипептида (XLVIIIa) с количественным выходом.

б) Из 0,83 г (3,00 ммоль) ацетата (XLVIIIa), 0,64 г (6,00 ммоль) NaHCO_3 и 1,31 г (3,00 ммоль) *Z-Trp-ONSu* в условиях опыта 5 получали 1,40 г (88%) тетрапептида (XLIX). Аминокислотный анализ: Gly 2,01 (2); Ala 0,98 (1).

48. *Z-Trp-Ala-D-Ala-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl (L)* получали из 1,50 г (2,80 ммоль) тетрапептида (XLIX), 0,31 мл (2,80 ммоль) *N*-метилморфолина, 0,36 мл (2,66 ммоль) изобутилхлорформата, 2,40 г (2,52 ммоль) трифторацетата (XVIa) и 0,28 мл (2,52 ммоль) *N*-метилморфолина по методике 7б. Аминокислотный анализ: Gly 2,03 (2); Ala 2,98 (3); Asp 1,02 (1); Ser 0,98 (1); Glu 1,03 (1).

49. *Trp-Ala-D-Ala-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu* (IX). 1,0 г (0,73 ммоль) пептида (L) гидрировали 20 ч и обрабатывали в условиях опыта 8. Сырой продукт (0,75 г) хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом А-25 в 0,3 М AcONH_4 , pH 6,7. Выход 0,44 г (70%).

50. *Boc-D-Ala-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl* (LI) (схема 4) получали из 1,80 г (1,98 ммоль) трифторацетата (XVIa), 0,22 мл (1,98 ммоль) N-метилморфолина и 0,56 г (1,98 ммоль) *Boc-D-Ala-ONSu* в условиях опыта 1 и кристаллизовали из этилацетата. Выход 1,20 г (80%). Аминокислотный анализ: Gly 1,04 (1); Ala 2,05 (2); Asp 0,97 (1); Ser 0,98 (1); Glu 1,01 (1).

51. *Z-Ala-Gly-OH* (LII) получали из 1,5 г (20,00 ммоль) H-Gly-OH, 0,80 г (20,00 ммоль) NaOH и 6,4 г (20,00 ммоль) *Z-Ala-ONSu* в условиях опыта 5 и кристаллизовали из смеси этилацетат — эфир. Выход 3,7 г (67%).

52. *Z-Trp-Ala-Gly-OH* (LIII). а) Из 2,80 г (10,00 ммоль) дипептида (LII) в условиях опыта 6а получали ацетат (LIIa) с количественным выходом.

б) Из 2,0 г (10,00 ммоль) ацетата (LIIa), 2,2 мл (20,00 ммоль) N-метилморфолина и 4,35 г (10,00 ммоль) *Z-Trp-ONSu* в условиях опыта 5 получали *Z-Trp-Ala-Gly-OH* (LIII) с выходом 2,8 г (62%). Аминокислотный анализ: Gly 1,01 (1); Ala 0,99 (1).

53. *Z-Trp-Ala-Gly-D-Ala-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl* (LIV) получали из 0,51 г (1,10 ммоль) трипептида (LIII), 0,12 мл (1,10 ммоль) N-метилморфолина, 0,14 мл (1,05 ммоль) изобутилхлорформата, 1,02 г (1,00 ммоль) трифторацетата (LIa) (получен из гексапептида (LI) в условиях опыта 4а с выходом 93%) и 0,11 мл (1,00 ммоль) N-метилморфолина по методике 7б. Выход 0,96 г (65%). Аминокислотный анализ: Gly 2,04 (2); Ala 2,97 (3); Asp 0,95 (1); Ser 0,97 (1); Glu 1,02 (1).

54. *Trp-Ala-Gly-D-Ala-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu* (X). 0,80 г (0,58 ммоль) защищенного нонапептида (LIV) гидрировали 20 ч и обрабатывали в условиях опыта 8. Сырой продукт (0,60 г) подвергали ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефадексом А-25 в градиентном режиме в интервале 0,2—0,3 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 6,7. Выход 0,10 г (20%).

55. *Boc-Gly-Glu(OBzl)-NH_2* (LV) (схема 5) получали из 2,36 г (10,00 ммоль) H-Glu(OBzl)-NH₂ [38], 2,84 г (10,00 ммоль) *Boc-Gly-ONp* и 1,35 г (10,00 ммоль) *HOBT* в условиях опыта 15 с выходом 3,10 г (79%). Кристаллизацию проводили из этилацетата.

56. *Boc-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-NH_2* (LVI) получали из 4,07 г (10,00 ммоль) трифторацетата (LVa) (получен из пептида (LV) в условиях опыта 2а с количественным выходом), 1,10 мл (10,00 ммоль) N-метилморфолина и 3,92 г (10,00 ммоль) *Boc-Ser(Bzl)-ONSu* в условиях опыта 1. Выход 4,10 г (72%). Кристаллизация из этилацетата.

57. *Boc-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-NH_2* (LVII) получали из 5,84 г (10,00 ммоль) трифторацетата (LVa) (получен из пептида (LVI) в условиях опыта 2а с количественным выходом), 2,86 г (10,00 ммоль) *Boc-Ala-ONSu* и 1,10 мл (10,00 ммоль) N-метилморфолина в условиях опыта 1. Выход 5,20 г (81%). Кристаллизация из этилацетата.

58. *Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-NH_2* (LVIII) получали из 3,20 г (5,00 ммоль) трифторацетата (LVIIa) (получен из пептида (LVII) по методике 4а с выходом 98%), 0,55 мл N-метилморфолина и 2,19 г (5,00 ммоль) *Boc-Asp(OBzl)-ONSu* в условиях опыта 1. Выход 3,90 г (93%). Кристаллизация из этилацетата. Аминокислотный анализ: Gly 1,01 (1); Ala 0,98 (1); Asp 1,03 (1); Ser 1,02 (2); Glu 0,97 (1).

59. *Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-NH_2* (LIX) получали из 1,44 г (2,75 ммоль) *Z-Trp-Ala-Gly-Gly-OH* (XVIII), 0,28 мл (2,63 ммоль) N-метилморфолина, 2,15 г (2,50 ммоль) трифторацетата (LVIIIa) (получен из пептида (LVIII) в условиях опыта 4а с выходом 98%), 0,27 мл (2,50 ммоль) N-метилморфолина по методике 7б. Выход

2,59 г (83%). Аминокислотный анализ: Gly 3,03 (3); Ala 1,97 (2); Asp 0,95 (1); Ser 0,97 (1); Glu 1,03 (1).

60. *Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-NH₂* (XI). 1,0 г (0,79 ммоль) пептида (LIX) гидрировали 20 ч и обрабатывали аналогично опыту 8. Сырой продукт (0,8 г) хроматографировали на DEAE-сефадексе А-25 в 0,2 М CH₃COONH₄, pH 6,7. Выход 0,38 г (57%).

61. *Boc-Asn-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl* (LX) (схема 5) получали из 3,78 г (5,00 ммоль) трифторацетата (XVa), 1,86 г (5,00 ммоль) Boc-Asn-ONp [39] и 0,68 г (5,00 ммоль) НОВТ в условиях опыта 15 с выходом 3,04 г (71%). Кристаллизация из этилацетата. Аминокислотный анализ: Gly 1,01 (1); Ala 0,97 (1); Asp 1,02 (1); Ser 1,05 (1); Glu 0,97 (1).

62. *Z-Trp-Ala-Gly-Gly-Asn-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-OBzl* (LXI) получали из 1,44 г (2,75 ммоль) пептида (XVIII), 0,28 мл (2,63 ммоль) N-метилморфолина, 2,17 г (2,5 ммоль) трифторацетата (LXa) (получен из пептида (LX) по методике 4a с выходом 96%) и 0,27 мл (2,50 ммоль) N-метилморфолина в условиях опыта 76. Выход 2,10 г (66%). Аминокислотный анализ: Gly 3,07 (3); Ala 1,99 (2); Asp 1,01 (1); Ser 0,98 (1); Glu 0,98 (1).

63. *Trp-Ala-Gly-Gly-Asn-Ala-Ser-Gly-Glu* (XII). 1,0 г (0,79 ммоль) пептида (LXI) гидрировали в условиях, описанных для пептида (I). Сырой продукт (0,7 г) хроматографировали на DEAE-сефадексе А-25 в 0,2 М CH₃COONH₄, pH 6,7. Выход 0,3 г (45%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Nagasaki H., Iriki M., Inoue S., Ushizono K. The presence of a sleep-promoting material in the brain of sleep-deprived rats.— Proc. Japan Acad., 1974, v. 50, № 3, p. 241–246.
2. Pappenheimer J. R., Koski G., Fencl U., Karnovsky M. L., Krueger J. Extraction of sleep-promoting factor S from cerebrospinal fluid and from brains of sleep deprived animals.— J. Neurophysiol., 1975, v. 38, № 12, p. 1299–1311.
3. Schoenenberger G. A., Maier P. F., Tobler H. J., Monnier M. A naturally occurring delta-EEG enhancing nonapeptide in rabbits.— Pflügers Arch., 1977, v. 369, № 1, p. 99–109.
4. Monnier M., Dudler L., Gächter R., Maier P. F., Tobler H. J., Schoenenberger G. A. The delta sleep inducing peptide (DSIP). Comparative properties of the original and synthetic nonapeptide.— Experientia, 1976, v. 33, № 4, p. 548–552.
5. Schoenenberger G. A., Monnier M. Characterization of a delta-electroencephalogram (δ-sleep)-inducing peptide.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 1282–1286.
6. Monnier M., Dudler L., Gächter R., Schoenenberger G. A. Delta sleep-inducing peptide (DSIP): EEG and motor activity in rabbits following intravenous administration.— Neurosci. Letters, 1977, v. 6, № 1, p. 9–13.
7. Mikhaleva I. I., Sargsyan A. S., Sumsкая L. V., Balashova T. A., Deshko T. N., Efremov E. S., Ivanov V. T. Synthesis, spectroscopic and biological properties of delta-sleep inducing peptide and its analogs.— In: Peptides. Structure and Biological Function. / Gross E., Meienhofer J., eds. Rockford: Pierce Chemical Company, 1979, p. 901–904.
8. Ivanov V. T., Mikhaleva I. I., Sargsyan A. S., Balashova T. A., Efremov E. S., Deshko T. N., Nabiev I. R., Balaban P. M. Physicochemical and biological properties of δ-sleep inducing peptide and its analogues.— In: Proceedings of the sixteenth European Peptide Symposium, Copenhagen, 1980 (in press).
9. Marks N., Stern F., Kastin A. J., Coy D. H. Degradation of delta sleep inducing peptide (DSIP) and its analogs by brain extracts.— Brain Res. Bull., 1977, v. 2, № 4, p. 491–493.
10. Laudano A. P., Doolittle R. F. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 7, p. 3085–3089.
11. Engelhard M., Merrifield R. B. Tyrosine protecting groups: minimization of a rearrangement to 3-alkyltyrosine during acidolysis.— J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, № 1, p. 3559–3563.
12. Bodanszky M., Kwei J. Side reactions in peptide synthesis.— Int. J. Pept. Prot. Res., 1978, v. 12, № 2, p. 69–74.
13. Yang C. C., Merrifield R. B. The β-phenacyl ester as a temporary protecting group to minimize cyclic imide formation during subsequent treatment of aspartyl peptides with HF.— J. Org. Chem., 1976, v. 41, № 6, p. 1032–1041.

14. *Beuerman H. C., De Leer E. W. B., Floor J.* On the repetitive excess mixed anhydride method for the synthesis of peptides. Synthesis of the sequence 1-10 of human growth hormone.—Recueil, 1973, v. 92, № 4, p. 481-492.
15. *Дейгин В. И., Уэльшин В. В., Иванов В. Т.* Высокоэффективная эксклюзионная жидкостная хроматография защищенных пептидов. Тез. V Всес. симпозиума по химии и физике белков и пептидов, Баку, 1980, с. 154.
16. *Kaji S., Monnier M., Gaillard J.-M.* The delta-sleep inducing peptide (DSIP) increases duration of sleep in rats.—Neurosci. Letters, 1979, v. 13, № 2, p. 169-172.
17. *Polc P., Schneeberger J., Haefely W.* Effect of the delta sleep-inducing peptide (DSIP) on the sleep-wakefulness cycle of cat.—Neurosci. Letters, 1978, v. 9, № 11, p. 33-36.
18. *Богословский М. М., Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Альбертин С. В.* Электрографические изменения в изолированной коре кошек под влиянием нейропептида сна.—Ж. эволюц. биохим. и физиол., 1979, т. 15, № 4, с. 430-433.
19. *Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Воронов И. Б., Богословский М. М., Демин Н. Н., Рубинская Н. П., Альбертин С. В.* Анализ действия нейропептида, вызывающего дельта-сон у кошек и белых крыс.—Ж. эволюц. биохим. и физиол., 1979, т. 15, № 5, с. 583-589.
20. *Медведев В. И., Базарев В. Д.* Исследование свойств олигопептида — нейромодулятора сна.—Ж. эволюц. биохим. и физиол., 1979, т. 15, № 4, с. 379-384.
21. *Ковальзон В. М., Цибульский В. Л.* Имеются ли гипногенные свойства у синтетического «пептида, вызывающего дельта-сон»? —Ж. высш. нервн. деят., 1980, т. 30, № 5, с. 1064-1066.
22. *Tobler L., Borbely A. A.* Effect of delta-sleep inducing peptide (DSIP) and arginine vasotocin (AVT) on sleep and motor activity in the rat.—Waking and Sleeping, 1980, v. 4, № 2, p. 139-153.
23. *Frontali N., Gainer H.* Peptides in invertebrate nervous systems.—In: Peptides in neurobiology. / Gainer H., ed. N. Y.: Plenum Press, 1977, p. 259-285.
24. *Barker J. L., Ifshin M. S., Gainer H.* Studies on bursting pacemaker potential activity in molluscan neurons III. Effects of hormones.—Brain Res., 1975, v. 84, № 3, p. 501-503.
25. *Кононенко И. И.* Эффект аппликации по сомму пачечного нейрона виноградной улитки — фактора, модулирующего электрическую активность.—Докл. АН СССР, 1980, т. 250, № 6, с. 1490-1493.
26. *Takuchi H., Tamura H., Nishizawa R.* Inhibitory effect of tripeptides, containing L-Phe-L-Tyr on neuronal excitability.—Eur. J. Pharmacol., 1979, v. 54, № 3, p. 393-396.
27. *Stefano G. B., Kream R. M., Zukin R. S.* Demonstration of stereospecific opiate binding in the nervous tissue of the marine mollusc *Mytilus edulis*.—Brain Res., 1980, v. 181, № 2, p. 440-445.
28. *Balaban P. M.* A system of command neurons in snail's escape behaviour.—Acta neurobiol. Exp., 1979, v. 39, № 2, p. 97-107.
29. *Ашмарин И. П., Доведова Е. Л.* Влияние пептида дельта-сна на активность ацетилхолинэстеразы и МАО в синапсоммах и митохондриях мозга кролика in vitro.—Докл. АН СССР, 1980, т. 255, № 6, с. 1501-1503.
30. *Fletcher G. A., Jones J. H.* A list of amino-acid derivatives which are useful in peptide synthesis.—Int. J. Pept. Prot. Res., 1972, v. 4, № 3, p. 347-371.
31. *Fletcher G. A., Jones J. H.* A supplementary list of amino-acid derivatives which are useful in peptide synthesis.—Int. J. Pept. Prot. Res., 1975, v. 7, № 2, p. 91-102.
32. *Brack A., Spach G.* Synthesis and conformations of periodic copolypeptides of L-alanine and glycine.—Biopolymers, 1972, v. 11, № 3, p. 563-586.
33. *Wieland T., Lapatsanis L., Faesel J., Konz W.* Synthese von Strukturvarianten des Antamanids.—Liebigs Ann. Chem., 1971, v. 74, № 5, p. 194-206.
34. *Weygand F., Steglich W.* Synthesen mit carbobenzoxy-derivaten.—Chem. Ber., 1960, v. 92, № 12, p. 2983-3005.
35. *Fairweather R., Jones J. H.* Sequential polipeptides. Part IV. The synthesis of poly(L-alanyl-glycyl-L-proline) and its stereoisomers.—J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 1972, № 15, p. 1908-1915.
36. *Steward J. M., Young J. D.* Solid Phase Peptide Synthesis. San Francisco: Freeman W. H. and Company, 1969, p. 31-32.
37. *Wang S. S., Gisin B. F., Winter D. P., Makofske I. D., Kulsha I. D., Tzougraki C., Meienhofer J.* Facile synthesis of amino acid and peptide esters under mild conditions via cesium salts.—J. Org. Chem., 1977, v. 42, № 8, p. 1286-1290.
38. *Sachs H., Brand E.* Benzyl esters of glutamic acid.—J. Amer. Chem. Soc., 1953, v. 75, № 18, p. 4610-4611.
39. *Lefrancier P., Choay J., Derrien M., Lederman J.* Synthesis of N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, as adjuvant of the immune response, and of some N-acetyl-muramyl-peptide analogs.—Int. J. Pept. Proc. Res., 1977, v. 9, № 6, p. 249-257.

Поступила в редакцию
25.11.1981

SYNTHESIS AND SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF δ -SLEEP INDUCING PEPTIDE AND ITS ANALOGS

MARGSYAN A. S., SUMSKAYA L. V., ALEXANDROVA I. Yu., BESRUKOV M. V., MIKHALEVA I. I., IVANOV V. T., BALABAN P. M.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Kupavna

With the aim of studying a structure-function relationship for δ -sleep inducing peptide (DSIP), the title compound and 11 its analogs were synthesized: a) analogs, containing Tyr in one of the positions 6-9 of the DSIP molecule; b) analogs having D-Ala residue in position 2, 3 or 4, analog with δ -aminovaleric acid instead of Gly-Gly moiety in positions 3-4, and undecapeptide analog with Gly-Pro segment at the N-terminus; c) DSIP derivatives with amidated β - or γ -carboxyls of Asp or Glu residues. Synthesis was accomplished by fragment condensation of two segments, each being prepared by a stepwise chain elongation. DSIP and some of its congeners manifested a specific and selective effect in the cell electrophysiological models - neurons of the snail *Helix lucorum* - causing inhibition by 30-40% of the endogenous electrical rhythm and an increase by 1-4 mv of the resting potential. The results of the testing the somnogenic action of DSIP on animals (rats, rabbits, cats) were discussed.
