



УДК 547.96.057

СИНТЕЗ ТЕТРАКОНТАПЕПТИДА — ГИПОТЕТИЧЕСКОГО ЭВОЛЮЦИОННОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

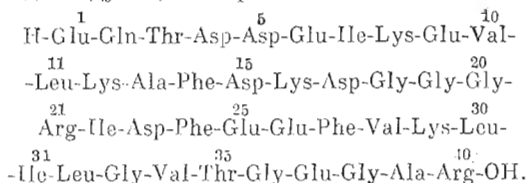
I. СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ (1—9), (10—14), (15—20), (21—26), (29—33), (34—40)

Гречишко В. С., Медведкин В. Н., Запевалова Н. П., Юнг Р., Митин Ю. В.*

*Институт белка Академии наук СССР, Пушкино
Московской обл.*

Методом пептафторфениловых эфиров синтезированы фрагменты (1—9), (10—14), (15—20), (21—26), (29—33) и (34—40) тетраконтапептида — гипотетического эволюционного предшественника кальцийсвязывающих белков. В реакционной смеси при синтезе фрагмента (15—20), содержащего последовательность -Asp(OBzl)-Gly-, обнаружено сукцинимидное производное, образование которого удалось избежать путем замены бензильной защитной группы на *трет*-бутильную. Для защиты α -карбоксила *S*-концевых аминокислот использована фенольная группа.

Ряд кальцийсвязывающих белков — парвальбумины, кальмодулин, тропонин С и другие — имеет ярко выраженное доменное строение. Парвальбумины имеют два кальцийсвязывающих домена [1], тропонин С и кальмодулин — четыре [2, 3]. Значительная аналогия в первичной структуре доменов кальцийсвязывающих белков позволила высказать гипотезу о возможности существования общего эволюционного предшественника этих белков и последующей дубликации его гена [4]. Структура эволюционного предшественника была предсказана Гудманом и Нешером [5]. Согласно их расчетам, эволюционный предшественник — это 40-членный пептид следующего строения:



В организмах, существующих в наше время, пептид подобной структуры до сих пор не был найден. Получение и исследование предсказанного эволюционного предшественника чрезвычайно важно, так как таким путем можно подтвердить существующие представления о возникновении семейства кальцийсвязывающих белков.

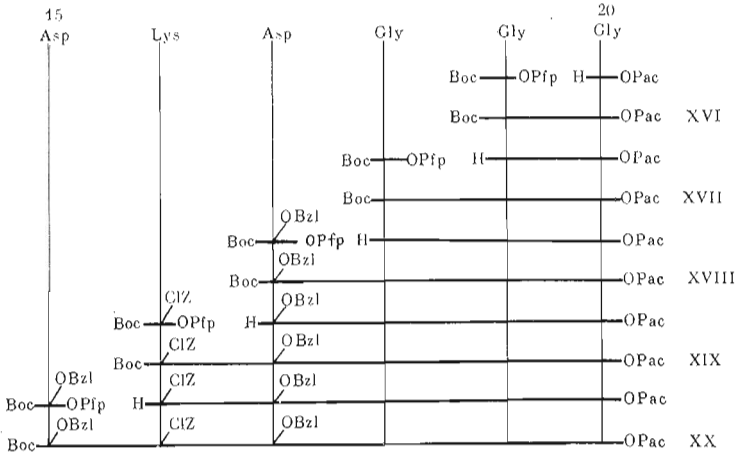
Мы поставили перед собой задачу синтезировать пептид предсказанной последовательности и изучить его свойства. Синтез, выполненный ранее при конденсации блоков по схеме (1—7) + (8—14) + (15—19) + (20—26) + (27—33) + (34—40), был сложен в осуществлении из-за низкой растворимости некоторых блоков [6]. В настоящей работе мы представляем блочный синтез тетраконтапептида по новой, более удобной схеме: (1—9) + (10—14) + (15—20) + (21—26) + 27+28 + (29—33) + (34—40).

Первое сообщение посвящено синтезу исходных фрагментов (1—9), (10—14), (15—20), (21—26), (29—33) и (34—40). Разбивка на указан-

* Адрес в настоящее время: Центральный институт генетики и исследований культурных растений, Гатерслебен, ГДР.

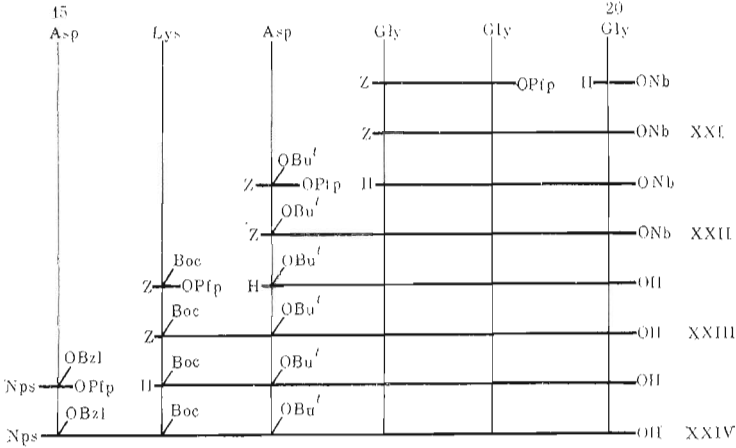
Сокращения: ClZ — 2-хлорбензилоксикарбонил, Nps — 2-нитрофенилсульфенил, Pас — фенолил, DMF — диметилформамид, TEA — триэтиламин, TFE — 2,2,2-трифторэтанол, DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, TFA — трифторуксусная кислота.

Схема 3



Первый вариант синтеза гексапептида (15–20)

Схема 4



Второй вариант синтеза гексапептида (15–20)

Все перечисленные пептиды получались ступенчатым присоединением аминокислот с помощью пентафторфениловых эфиров [8]. Гептапептид (34–40) (схема 7) был получен конденсацией пентапептида (34–38) и дипептида (39–40). Это обусловлено тем, что пентапептид (34–38) использовался также для синтеза [Lys⁴⁰]тетракопептида.

При синтезе фрагментов следовало иметь в виду, что для последующих конденсаций α -карбоксильная группа С-концевой аминокислоты фрагмента должна быть свободной. Вследствие этого необходимо было либо подобрать подходящую защиту для α -карбоксильной группы, либо проводить ступенчатый синтез фрагмента, оставляя α -карбоксильную группу С-концевой аминокислоты свободной. Мы, идя по первому пути, широко использовали в этих целях феноцильную группу. Рас-защита удобна тем, что она совершенно устойчива в условиях свечения N ^{α} -Boc-группы трифторуксусной кислоты или хлористым водородом. В то же время Рас-группа может быть селективно удалена в присутствии защитных групп как бензильного, так и *tert*-бутильного типа [9–11]. Рас-группа применялась в синтезе всех перечисленных фрагментов, кроме фрагмента (15–20) (схема 4). Это исключение объясняется тем, что при синтезе фрагмента (15–20) мы вынуждены были использовать в качестве временной защитной группы Z-группу, удаляемую на каждой стадии гидролизом, что не может сочетаться с Рас-группой. Фрагмент

Схема 5

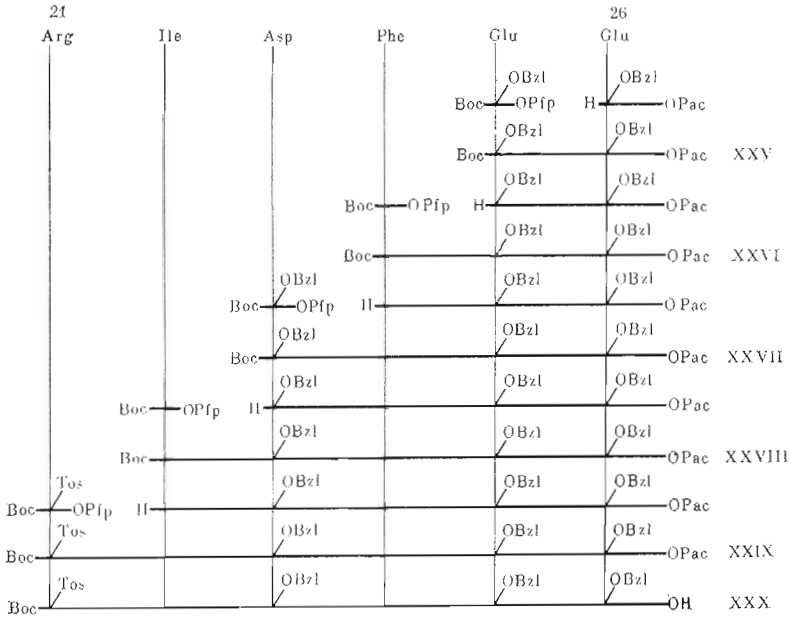
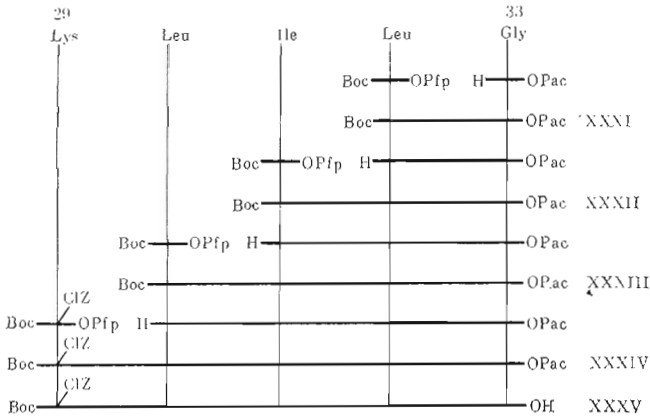
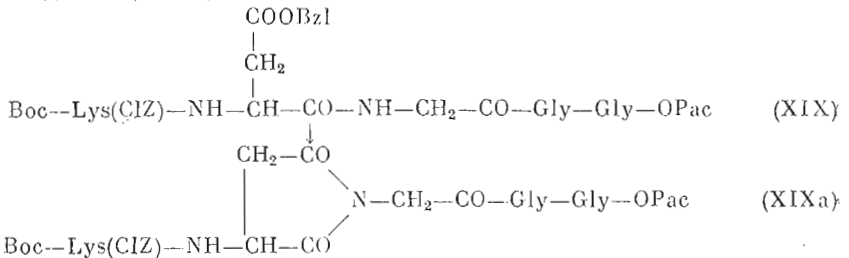


Схема 6



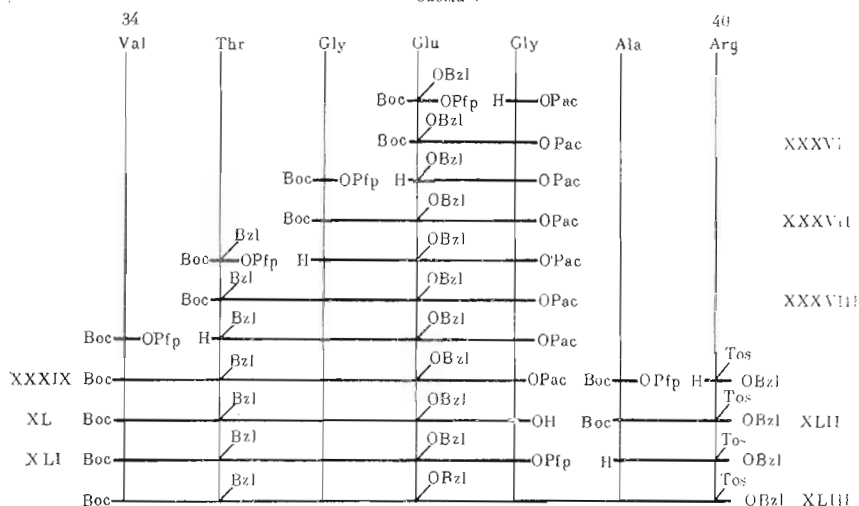
(15–20) был синтезирован с незащищенной С-концевой α -карбоксовой группой.

При попытке синтеза фрагмента (15–20) по схеме 3 мы столкнулись с трудностью, связанной с побочным процессом образования сукцинимидного производного (XIXa) на стадии синтеза пентапептида.



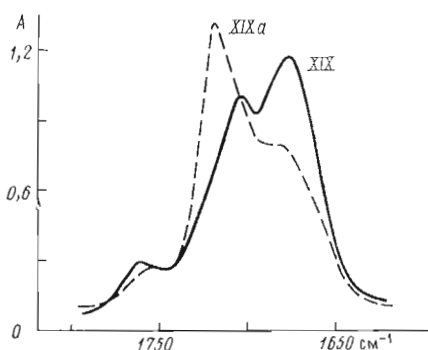
Этот побочный процесс легко протекает как в кислой, так и в щелочной среде, что неоднократно отмечалось в литературе [12–14]. Оба продукта удается выделить из реакционной смеси колоночной хроматогра-

Схема 7



Синтез гептапептида (34-40)

ИК-спектры пептидов (XIX) и (XIXa) в хлороформе в области $1800-1600 \text{ см}^{-1}$ (спектрофотометр Perkin-Elmer 180, США)



Фией на силикагеле в системе хлороформ — этанол (20:1) и получить с выходом 15 и 67% соответственно пептиды (XIX) и (XIXa) в виде, достаточно чистом для анализа.

Результаты элементного анализа пептида (16-20), полученного по схеме 3 (табл. 1), и ИК-спектры продуктов этой стадии (рисунок) четко указывают на образование сукцинимидного производного: максимум при 1720 см^{-1} на рисунке соответствует карбонилу имида [15]. Чтобы избежать этого нежелательного процесса, мы вынуждены были изменить схему синтеза гексапептида (15-20). В новой схеме 4 в качестве постоянных защит для остатков Lys¹⁶ и Asp¹⁷ мы использовали Boc- и OBz^t-группы соответственно. Это позволило без особого труда синтезировать желаемый гексапептид.

Как правило, все пептиды после обычной обработки реакционной смеси и перекристаллизации или пересаживания получались вполне чистыми. Однако в некоторых случаях необходима была хроматографическая

Таблица 1

Анализ пептидов (XIX) и (XIXa)

Пептид	Брутто-формула	Рассчитано			Найдено		
		C	H	N	C	H	N
XIX	$C_{44}H_{53}N_6O_{13}Cl$	58,12	5,83	9,25	58,03	5,89	9,41
XIXa	$C_{37}H_{45}N_6O_{12}Cl$	55,46	5,62	10,49	55,12	5,74	10,31

очистка на колонке с силикагелем. В связи с этим интересно отметить, что в качестве растворителя для элюции с колонки хорошо себя зарекомендовала смесь хлороформ — трифторэтанол в соотношениях от 99:1 до 90:10.

Что касается ТСХ, то наряду с общезвестными системами на основе хлороформа с метанолом очень хорошо себя зарекомендовала система, состоящая из хлороформа, трифторэтанола, трифторуксусной кислоты и гексафторбензола. Эта система особенно удобна для хроматографии крупных пептидов, так как дает четкое разделение всех продуктов.

Экспериментальная часть

В работе использовали производные аминокислот фирмы Reanal и Fluka, пентафторфенол отечественного производства. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) и Merck 60F 254 (ФРГ) в следующих системах растворителей: хлороформ — метанол — гексан, 9:1:5 (А); хлороформ — метанол — бензол, 9:1:1 (Б); хлороформ — трифторэтанол — трифторуксусная кислота, 9:1:0,1 (В); хлороформ — трифторэтанол — трифторуксусная кислота — гексафторбензол, 7:3:0,6:4 (Г); хлороформ — трифторэтанол — трифторуксусная кислота — гексафторбензол, 7,5:2,5:0,6:2 (Д); хлороформ — трифторэтанол — трифторуксусная кислота — гексафторбензол, 7,5:2,5:0,8:3 (Е); хлороформ — трифторэтанол — трифторуксусная кислота — гексафторбензол, 7,5:2,5:0,2:4 (Ж).

Температуру плавления определяли на приборе Voelius (ГДР) (не исправляли), элементный анализ проводили на С, Н, N-анализаторе Perkin — Elmer 240В (США), удельное вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141А (США), аминокислотный анализ проводили на анализаторе Durrum D500 (США). Высоковольтный электрофорез на бумаге осуществляли на приборе ОЕ-201 (Венгрия) в 30% уксусной кислоте, колоночную хроматографию — на силикагеле L 40/100 (Chemapol, ЧССР). Пентафторфениловые эфиры N-защитенных аминокислот получали по методике [8].

Типовая методика синтеза пептидов с помощью пентафторфениловых эфиров. Раствор 1 экв. пентафторфенилового эфира в DMF (обычно 1 М концентрация) охлаждали до 4° С и к нему добавляли порциями по 0,1 экв. одновременно хлоридрата аминокислоты и триэтиламин. Перед добавлением очередной порции с помощью ТСХ проверяли полноту парасходования предыдущей порции аминокислоты. В общей сложности добавляли по 0,9 экв. аминокислоты и ТЕА. По завершении реакции температуру раствора доводили до комнатной, добавляли 10-кратный объем этилацетата, полученный раствор промывали последовательно 10% NaHSO₄, насыщенным раствором NaHCO₃, водой. После отгонки растворителя полученный продукт подвергали соответствующей очистке (табл. 2). В том случае, если продукт реакции не растворялся в этилацетате, реакционную смесь выливали в 10% NaHSO₄, осадок вновь растворяли в DMF и осаждали в воду, затем продукт пересаждали из DMF в насыщенный раствор NaHCO₃ и, наконец, дважды в воду. Полученный осадок сушили азеотропной отгонкой с диоксаном и затем подвергали очистке: кристаллизации, колоночной хроматографии или пересаживанию (табл. 2). По описанной методике было получено подавляющее большинство пептидов, представленных в табл. 2: (I) — (VIII), (X) — (XIII), (XVI) — (XIX), (XXII), (XXV) — (XXVIII), (XXXI) — (XXXIV), (XXXVI) — (XXXIX) и (XLII). Синтез остальных пептидов проводился по другим методикам, описание которых приведено ниже.

Boc-Glu(OBzl)-Gln-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-Phe-Lys(CIZ)-Glu(OBzl)-OH (IX). К охлажденному до 4° С раствору 2,03 г (1 ммоль) соединения (VIII) в 30 мл смеси DMF — уксусная кислота (2:1) при интенсивном перемешивании добавляли порциями 2,20 г цинкового порошка. Через 2 ч оставшийся цинк отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток трижды пересаждали из DMF в 10% раствор KHSO₄ для удаления ацетата цинка. Полученный продукт промывали водой и дважды пересаждали из DMF в воду. Осадок высушивали азеотропной отгонкой с диоксаном, растворяли в смеси хлороформ — трифторэтанол (1:1) и осаждали в изопропанол. Выход пептида (IX) 1,63 г. Аминокислотный анализ: Asp 1,98 (2), Thr 0,89 (1), Glx 3,94 (4), Phe 1,10 (1), Lys 1,09 (1).

Boc-Val-Leu-Lys(CIZ)-Ala-Phe-OH (XIV). К раствору 3,37 г (3,5 ммоль) соединения (XIII) в 35 мл смеси трифторэтанол — хлороформ — уксусная кислота (10:3,5:20), охлажденному до -20° С, добавляли при перемешивании 8,0 г цинкового порошка порциями в течение 2 ч. Затем обрабатывали как описано для соединения (IX). После пересаживания из диоксана в эфир получали 2,69 г пептида (XIV).

Nps-Val-Leu-Lys(CIZ)-Ala-Phe-OH (XV). Растворяли 4,00 г (4,7 ммоль) соединения (XIV) в 25 мл TFA при 0° С, выдерживали 15 мин при 20° С, упаривали в вакууме, остаток обрабатывали эфиром и получали 3,92 г (97%) трифторацетата пентапептида, который растворяли в 120 мл смеси хлороформ — трифторэтанол (2:1) и добавляли 1,27 мл (9,08 ммоль) ТЕА. К полученному раствору в течение 2 ч параллельно добавляли раствор 0,63 мл (4,54 ммоль) ТЕА в 20 мл хлороформа и раствор 0,86 г (4,45 ммоль) Nps-хлорида в 20 мл хлороформа. Растворители удаляли в вакууме, остаток промывали эфиром и водой, затем растворяли в диоксане и осаждали в 10% раствор KHSO₄. Осадок промывали водой, сушили над P₂O₅ в вакууме, затем трижды

Свойства синтезированных пептидов *

Пеп- тид	Выход, %	Способ очистки **	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{22}$ (с 1, DMF), град	R_f	Систе- ма
I	70	K, EtOAc/гексан	130--131	-23,5	0,30	В
II	86	II, EtOAc/гексан	Аморф.	-19,7	0,42	В
III	94	Хр, CHCl ₃ /EtOH (8:2)	»	-19,1	0,38	В
IV	90	II, CHCl ₃ /Pr ^t OH	»	-15,1	0,32	В
V	88	Хр, CHCl ₃ /EtOH (98:2 → 4:1)	»	-18,0	0,37	В
VI	81	Хр, CHCl ₃ /EtOH (95:5 → 4:1)	»	-12,8	0,31	В
VII	96	II, CHCl ₃ +TFE - Pr ^t OH	»	-12,3	0,34	В
VIII	94	II, CHCl ₃ +TFE - Pr ^t OH	»	-9,9	0,31	В
IX	85	II, CHCl ₃ +TFE - Pr ^t OH	»	-9,5	0,28; 0,53	В, Г
X	77	K, эфир	111--113	-20,0	0,58	Б
XI	92	K, EtOAc	145--147	-15,3	0,59; 0,58	В, В
XII	95	K, диоксан/EtOAc	184--185	-18,3	0,32	В
XIII	93	II, диоксан - эфир	Аморф.	-7,9	0,43	В
XIV	90	То же	»	-15,5	0,36	В
XV	89	»	»	-14,8	0,38	В
XVI	82	K, EtOAc/эфир/гексан	85--86		0,28	Б
XVII	97	K, EtOAc	115--116		0,21	Б
XVIII	95	K, EtOAc	69--72	-12,8	0,26	Б
XIX		II, EtOAc - эфир	Аморф.	-13,2	0,26	Д
XXI	96	K, DMF/эфир	151--153		0,37	Б
XXII	94	Хр, CHCl ₃ /EtOH (99:1); K, EtOAc/эфир	127--129	-11,5	0,30	Б
XXIII	96	Хр, CHCl ₃ /EtOH (20:1); K, Pr ^t OH/эфир	93--98	-19,5	0,23	Б
XXIV	93	Хр, CHCl ₃ /TFE (99:1 → 90:10)	Аморф.	-15,6	0,46; 0,61	В, Е
XXV	96	K, эфир	111--112	-16,5	0,71	Б
XXVI	97	K, EtOAc/эфир	154--154,5	-15,4	0,53	Б
XXVII	92	K, Pr ^t OH	145--148	-12,9	0,51	Б
XXVIII	97	K, диоксан/эфир	155--160	-18,2	0,47	Б
XXIX	97	II, DMF - эфир	Аморф.	-16,0	0,42	Б
XXX	84	Хр, CHCl ₃ /TFE (20:1 → 4:1)	»	-12,5	0,23	Б
XXXI	88	K, эфир	111--112	-23,5 **	0,70	Б
XXXII	93	K, гексан	153--155	-41,2 **	0,53	Б
XXXIII	97	K, EtOAc/гексан	201--203	-31,0	0,61	Б
XXXIV	97	II, диоксан - эфир	Аморф.	-28,0	0,31	Б
XXXV	88	Хр, CHCl ₃ /EtOAc (20:1 → 10:1)	»	-29,5	0,26	Б
XXXVI	93	K, EtOAc/эфир	110	-12,1 **	0,50	Б
XXXVII	98	K, EtOAc/гексан	99--101	-14,4 **	0,32	Б
XXXVIII	92	K, Pr ^t OH	138--138,5	-1,2	0,55	Б
XXXIX	98	K, Pr ^t OH	190--192	+2,8	0,59	Б
XL	93	II, MeOH - эфир	Аморф.	+5,3	0,35	Б
XLI	91	II, DMF - эфир	»	+2,7	0,75	Ж
XLII	93	Хр, CHCl ₃ - CHCl ₃ /EtOH (5:1)	»	-30,0 **	0,20	Д
XLIII	92	II, Pr ^t OH - эфир	»	-5,3	0,10	Ж

* Результаты элементного анализа совпадают с рассчитанными величинами.

** K — кристаллизация, Хр — колоночная хроматография на силикагеле, II — переосаждение.

** Измерено в MeOH.

переосадили из диоксана в эфир. Выход пептида (XV) 3,63 г. Аминокислотный анализ: Ala 0,98 (1), Val 1,01 (1), Leu 1,01 (1), Phe 1,0 (1), Lys 0,99 (1).

Z-Gly-Gly-OPfp. К раствору 13,30 г (50 ммоль) *Z-Gly-Gly-OH* и 10,20 г (55,4 ммоль) пентафторофенола в 120 мл DMF добавляли при -20° С 11,33 г (55 ммоль) DCC. Затем температуру поднимали до 4° С, перемешивали 3 ч, отфильтровывали N,N'-дициклогексилмочевину, уааривали в вакууме. Остаток растворяли в 150 мл этилацетата, выдерживали 15 ч при -20° С, фильтровали и продукт осаждали гексаном. Осадок дважды кристаллизовали из этилацетата с гексаном. Т. пл. 111--112° С, R_f 0,43 (A). Выход *Z-Gly-Gly-OPfp* 21,00 г (97%). Найдено, %: С 50,50; Н 3,27; N 6,42. C₁₈H₁₃N₂O₅F₅. Вычислено, %: С 50,00; Н 3,01; N 6,48.

Z-Gly-Gly-Gly-ONb (XXI). К раствору 19,00 г (44 ммоль) *Z-Gly-Gly-OPfp* и 14,17 г (40 ммоль) Tos-OH-H-Gly-ONb в 40 мл DMF при 4° С добавляли 5,6 мл (40 ммоль) TEA. Через 3 ч выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, растворяли в горячем DMF (60° С) и выливали в охлажденный до 0° С 10% раствор KHSO₄. Осадок промывали водой, насыщенным раствором NaHCO₃, водой, затем опять растворяли в горячем DMF и осаждали в воду. Продукт кристаллизовали из DMF с эфиром. Выход пептида (XXI) 17,60 г.

Z-Lys(Boc)-Asp(OBu⁴)-Gly-Gly-Gly-OH (XXIII). Суспендировали 3,60 г (10 ммоль) *N*-Asp(OBu⁴)-Gly-Gly-Gly-OH, полученного гидрированием над Pd *Z*-Asp(OBu⁴)-Gly-Gly-Gly-ONb (XXII) в смеси метанол – муравьиная кислота (95 : 5) с последующей нейтрализацией формиата тетрапептида ТЕА в метаноле, в 40 мл гексаметилтриамина фосфорной кислоты. К суспензии добавляли 1,4 мл (10 ммоль) ТЕА и 1,84 г (10 ммоль) пентафторфенола, после перемешивания в течение 2 ч получали прозрачный раствор. К охлажденному до 4° С раствору порциями добавляли 5,18 г (9,5 ммоль) *Z*-Lys(Boc)-OPfp и через 2 ч 400 мл этилацетата, промывали 10% KHSO_4 и водой. Полученный после отгонки растворителя продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте хлороформ/трифторэтанол (20 : 1) и кристаллизовали из изопропанола с эфиром. Выход пептида (XXIII) 6,59 г.

Boc-Arg(Tos)-Ile-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OPac (XXIX). К раствору 4,50 г (16,2 ммоль) *Boc-Arg(Tos)-OH* и 3 г (16,2 ммоль) пентафторфенола в 40 мл хлороформа, охлажденному до –20° С, добавляли 3,30 г (16 ммоль) DCC. Через 30 мин отфильтровывали *N,N'*-дициклогексимочевину, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в 10 мл этилацетата, выдерживали 1 ч при –20° С, фильтровали, растворитель удаляли в вакууме. Полученный таким образом пентафторфениловый эфир, содержащий в качестве примеси соответствующий лактам [16], без дальнейшей очистки вводили в реакцию с 5,80 г (5,4 ммоль) $\text{HCl} \cdot \text{H-Ile-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OPac}$ (полученного из соединения (XXVII) обработкой TFA с добавлением HCl в диоксане) в 30 мл DMF. Раствор охлаждали до –15° С и добавляли 0,76 мл (5,4 ммоль) ТЕА, затем перемешивали 1 ч при 4° С и выливали в 10% KHSO_4 . Осадок растворяли в DMF и осаждали в воду, затем подобную операцию проводили, осаждая в раствор NaHCO_3 и, накопец, опять в воду. Продукт высушивали азотропной отгонкой с диоксаном и пересаждали из DMF в эфир. Выход пептида (XXIX) 7,62 г. Найдено, %: С 60,28; Н 6,00; N 8,14. $\text{C}_{76}\text{H}_{91}\text{N}_9\text{O}_{18}\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 60,67; Н 6,45; N 8,38.

Nps-Asp(OBzl)-Lys(Boc)-Asp(OBu⁴)-Gly-Gly-Gly-OH (XXIV). Растворяли 8,50 г (14,4 ммоль) *N*-Lys(Boc)-Asp(OBu⁴)-Gly-Gly-Gly-OH (полученного гидролизом соединения (XXIII) над Pd в смеси метанол – муравьиная кислота (95 : 5), как описано при синтезе (XXIII)) в 60 мл DMF, содержащего 2,00 мл (14,5 ммоль) TFA и 5,30 г (28,8 ммоль) пентафторфенола, охлаждали до 4° С и к полученному раствору добавляли по каплям в течение 30 мин раствор 7,45 г (13,7 ммоль) *Nps-Asp(OBzl)-OPfp* в 5 мл DMF. После этого к раствору добавляли еще 0,4 мл ТЕА и 0,27 мл (3 ммоль) β -диметиламиноэтиламина, температуру повышали до комнатной и выливали в 10% раствор KHSO_4 , доведенный до pH 3,5 добавлением 1 и. NaOH . Осадок промывали водой, сушили азотропной отгонкой с диоксаном и обрабатывали эфиром. Продукт пересаждали из этанола в эфир и затем очищали колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте хлороформ/трифторэтанол (99 : 1–90 : 10). Выход пептида (XXIV) 12,40 г. Аминокислотный анализ: Asp 1,93 (2), Gly 3,12 (3), Lys 0,95 (1).

Boc-Arg(Tos)-Ile-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Gly(OBzl)-OH (XXX). К раствору 5,8 г (4 ммоль) соединения (XXIX) в 20 мл смеси трифторэтанол – уксусная кислота (3 : 1), охлажденному до 4° С, при интенсивном перемешивании добавляли порциями 5,2 г цинка. Через 3 ч смесь обрабатывали как описано для соединения (IX). Полученный продукт очищали хроматографией на силикагеле в градиенте хлороформ/трифторэтанол (20 : 1–4 : 1). Выход пептида (XXX) 4,48 г. Аминокислотный анализ: Asp 0,98 (1), Glu 2,01 (2), Ile 1,01 (1), Phe 1,01 (1), Arg 0,99 (1).

Boc-Lys(CIz)-Leu-Ile-Leu-Gly-OH (XXXV). К раствору 14,0 г (15 ммоль) соединения (XXXIV) в 45 мл смеси DMF – уксусная кислота (2 : 1) при 4° С при перемешивании порциями добавляли 17 г цинка. Через 30 мин смесь обрабатывали как описано для соединения (IX). Продукт очищали хроматографией на силикагеле в градиенте хлороформ/этанол (20 : 1–10 : 1). Выход пептида (XXXV) 10,7 г. Аминокислотный анализ: Gly 1,1 (1), Leu 1,95 (2), Ile 0,95 (1), Lys 1,0 (1).

Boc-Val-Thr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-OH (XL). К раствору 8,6 г (10 ммоль) соединения (XXXIX) в 30 мл смеси DMF – уксусная кислота (2 : 1) при 4° С при перемешивании добавляли порциями 13 г цинка. Через 1,5 ч смесь обрабатывали как описано для соединения (IX). Продукт дважды пересаждали из метанола в эфир. Выход пептида (XL) 6,9 г. Аминокислотный анализ: Thr 0,85 (1), Glu 0,98 (1), Gly 2,17 (2), Val 1,0 (1).

Boc-Val-Thr(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-OPfp (XLI). К раствору 7,42 г (10 ммоль) соединения (XL) и 2,2 г (12 ммоль) пентафторфенола в 30 мл DMF, охлажденному до –20° С, добавляли 2,47 г (12 ммоль) DCC и полученный раствор перемешивали 3 ч при 4° С. Затем отфильтровывали *N,N'*-дициклогексимочевину, фильтрат оставляли на 15 ч при –20° С, снова фильтровали и упаривали в вакууме. Продукт обрабатывали эфиром и дважды пересаждали из DMF в эфир. Выход соединения (XLI) 8,26 г. Найдено, %: С 57,30; Н 5,68; N 7,61. $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{F}_8$. Вычислено, %: С 56,89; Н 5,51; N 7,72.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kretsinger R. H. // Nature New Biol. 1972. V. 240. № 98. P. 85–88.
2. Pechere J.-F., Capony J.-P., Ryden L. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 23. № 3. P. 421–428.
3. Klee C. B., Crouch T. H., Richman P. G. // Annu. Rev. Biochem. 1980. V. 49. P. 489–515.
4. Weeds A. C., McLachlan A. D. // Nature. 1974. V. 252. № 5485. P. 646–649.
5. Coodman M., Pechere J.-F. // J. Mol. Evol. 1977. V. 9. № 2. P. 131–158.

6. Maximov E. E., Zapevalova N. P., Milin Yu. V. // FEBS Lett. 1978. № 1. V. 88. P. 80-82.
7. Yamashiro D., Li C. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1973. V. 95. № 4. P. 1310-1315.
8. Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I. // Lieb. Ann. Chem. 1973. № 9. P. 1421-1429.
9. Stelakatos G. C., Paganou A., Zervas L. // J. Chem. Soc. (C). 1966. № 13. P. 1191-1199.
10. Hendrickson G. B., Kandall C. // Tetrahedron Lett. 1970. № 5. P. 343-344.
11. Понова О. Ю., Юнг Р., Мурин Ю. В. // Журн. орган. химии. 1982. Т. 18. № 8. С. 1716-1720.
12. Blake J. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1979. V. 13. № 4. P. 418-425.
13. Suzuki K., Endo N. // Chem. Pharm. Bull. 1978. V. 26. № 8. P. 2269-2274.
14. Bodanszky M., Tolle J. C., Deshmane S. S., Bodanszky A. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1978. V. 12. № 2. P. 57-68.
15. Bodanszky M., Natarajan S. // J. Org. Chem. 1975. V. 40. № 17. P. 2495-2499.
16. Kovacz J., Hsieh Y., Holleran E. M., Ting Y. E. // Peptides 1978. Wroclaw Univ. Press. 1979. P. 159-164.

Поступила в редакцию
18.XI.1986
После доработки
2.IV.1987

**SYNTHESIS OF A TETRACONTAPEPTIDE, HYPOTHETICAL
ANCESTOR OF CALCIUM-BINDING PROTEINS. I. SYNTHESIS
OF FRAGMENTS (1-9), (10-14), (15-20), (21-26),**

(29-33) and (34-40)

GRECHISHKO V. S., MEDVEDKIN V. N., ZAPEVALOVA N. P., JUNG R.,
MITIN Yu. V.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences
of The USSR, Pushchino, Moscow Region*

Fragments (1-9), (10-14), (15-20), (21-26), (29-33) and (34-40) of a tetracon-
tapeptide hypothetical ancestor of calcium-binding proteins were synthesised with the
use of pentafluorophenyl esters. Formation of a succinimide derivative was detected
during synthesis of fragment (15-20) containing Asp(OBzl)-Gly sequence. To avoid
this side process, *tert*-butylprotecting group was used instead of benzyl group. α -Car-
boxyls of C-terminal amino acids were protected by phenacyl group.