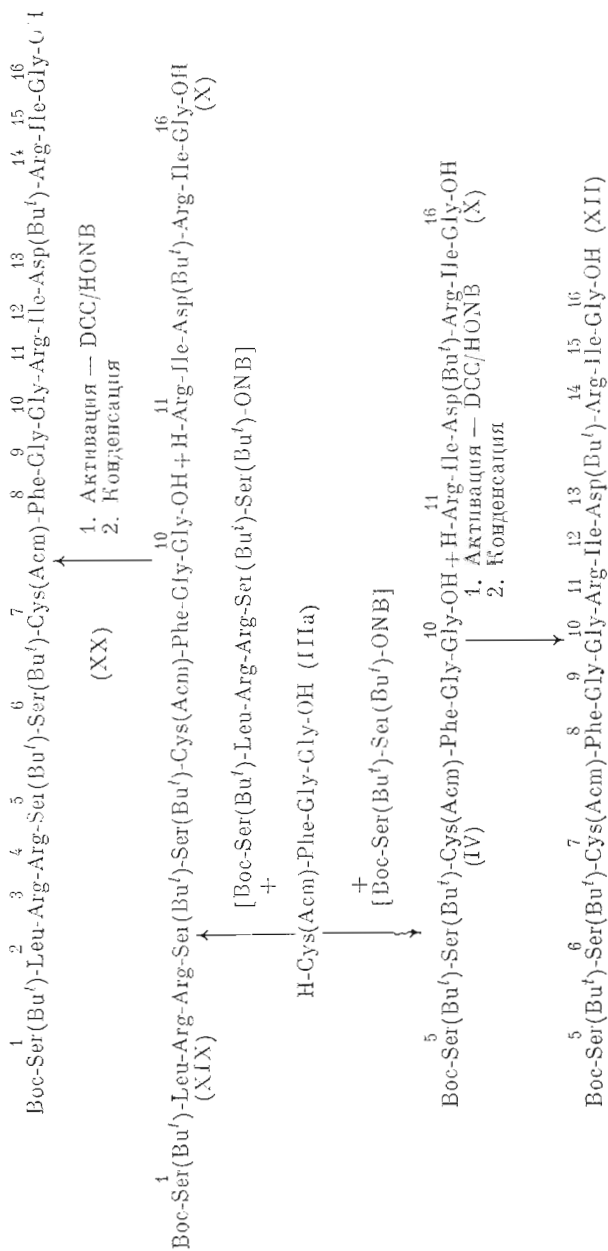
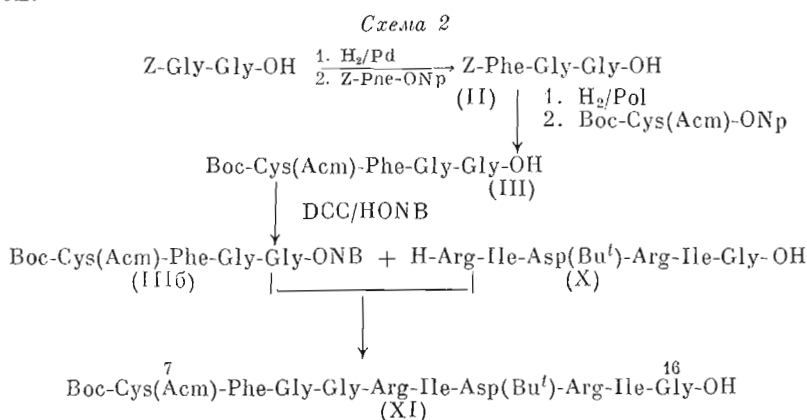


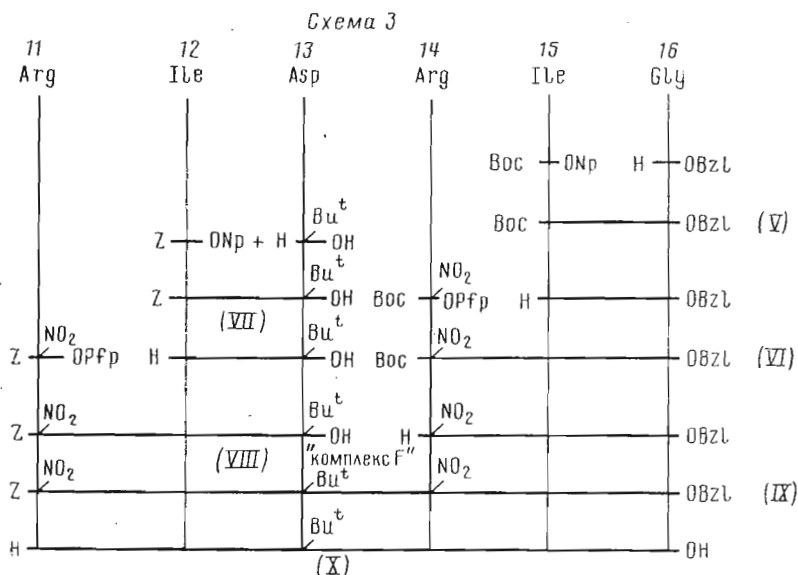
Схема 1



Цистеин вводился в синтез в виде N^{α} -Вос,S-Асм-производного. Для защиты гуанидиновой группы остатка аргинина использовали нитрогруппу. α -Аминогруппы защищали с помощью Z- или Вос-групп, а боковые функции остатков серина и аспарагиновой кислоты — *tert*-бутильной защитой.



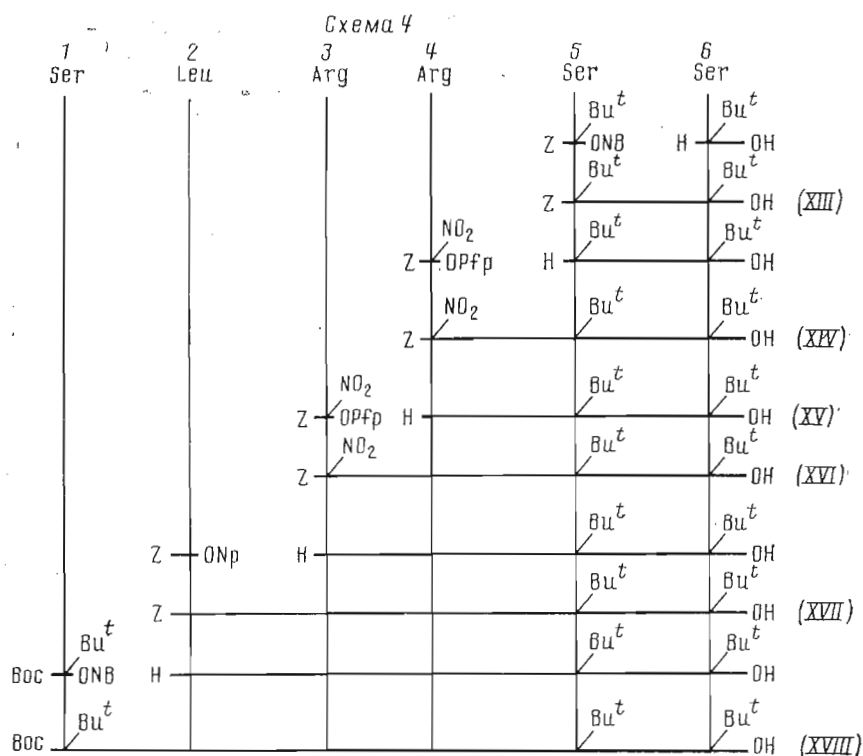
Получение гексапептидного фрагмента (X) последовательности 11—16 первоначально планировалось проводить последовательным наращиванием пептидной цепи по одной аминокислоте, начиная с остатка глицина. Однако в процессе синтеза оказалось, что защищенный пентапептид Z-Ile-Asp(OBu^t)-Arg-Ile-Gly-OH практически нерастворим, что сделало невозможным избирательное удаление Z-группы. Поэтому в дальнейшем синтез проводили путем конденсации двух трипептидных фрагментов с использованием «комплекса F» в качестве конденсирующего агента (схема 3).



После конденсации *n*-нитрофенилового эфира Вос-изолейцина с бензильным эфиром глицина и удаления *tert*-бутилоксикарбонильной группы с помощью трифторуксусной кислоты смесь обрабатывали дауэксом в OH⁻форме при —40° С в водном изопропиловом спирте. Полученный дипептид H-Ile-Gly-OBzl вводили в синтез с пентафторфениловым эфиром N^{α} -Вос, N^{ω} -NO₂-аргинина, процедуру удаления защитной группы повторяли и получали H-Arg(NO₂)-Ile-Gly-OBzl. Параллельно осуществляли синтез защищенного трипептида Z-Arg(NO₂)-Ile-Asp(OBu^t)-OH (VIII) последовательным наращиванием аминокислотных остатков (см. схему 3).

Удаление защитных групп с полученного после конденсации двух трипептидов гексапептида (IX) пришлось проводить в уксусной кислоте, так как, с одной стороны, полученное соединение плохо растворимо в других растворителях, а с другой — гидрирование в других растворителях приводит к образованию побочных продуктов (по данным ТСХ). Введение полученного непосредственно после гидрогенолиза, осаждения и сушки на воздухе соединения (X) в конденсацию вызывало образование побочного продукта, который, по данным ПМР, оказался ацетильным производным соединения (X). Поэтому нами была предпринята попытка обработать полученный гексапептид анионообменной смолой с целью удаления ацетатных ионов. При этом происходило быстрое (примерно за 2 ч) и однозначное (по данным ТСХ) превращение нашего пептида в продукт, имеющий меньшее значение R_f . Выделение этого продукта и исследование его методом ВЭЖХ показало, что он состоит из двух соединений в соотношении 7 : 3. Дальнейшее изучение методом ПМР позволило заключить, что в данном случае мы столкнулись с распространенной побочной реакцией образования смеси α - и β -пептидных связей по остатку аспарагиновой кислоты с одновременным удалением *трет*-бутильной группы. По литературным данным [2—5], подобные превращения характерны для метиловых и бензиловых эфиров аспарагиновой кислоты и в значительно меньшей степени присущи *трет*-бутиловым эфирам. Столь легкое превращение в данном случае может быть связано с конкретной структурой рассматриваемого пептида, а именно с наличием двух остатков аргинина в непосредственной близости от аспарагиновой кислоты. В связи с вышесказанным в дальнейшем перед введением в синтез соединения (X) подвергалось длительной (~48 ч) сушке в вакууме над щелочью.

Синтез тетрапептида последовательности 7—10 был осуществлен исходя из глицилглицина, последовательным наращиванием аминокислотной цепи. При этом остатки фенилаланина и цистеина вводились в синтез в виде соответствующим образом защищенных *n*-нитрофениловых эфиров. Для удаления Вос-защиты с полученного тетрапептида использовали как трифторуксусную, так и 85% муравьиную кислоты. Полученную таким образом соль обрабатывали анионитом в AsO^- -форме и после выделения



и продолжительной сушки в вакууме над щелочью вводили в дальнейший синтез.

Дипептидный фрагмент 5—6 (I) был получен конденсацией *N*-гидроксинорборнениового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-*O*-*трет*-бутилсерина с *O*-*трет*-бутилсерином, причем карбоксильная группа последнего защищалась солеобразованием с органическим основанием. Защищенный дипептид был получен в виде кристаллической соли с дициклогексиламином.

Синтез *N*-концевого гексапептида последовательности 1—6 (XVIII) осуществлялся последовательным наращиванием аминокислотных остатков, начиная с *C*-концевого остатка Ser⁶. Карбоксильную функцию защищали солеобразованием. После введения первого остатка аргинина (схема 4) продукты реакции подвергали хроматографированию на силикагеле. Особенности трудности встретились при удалении защитных групп с остатков аргинина (соединения (XIV), (XVI)). Удовлетворительные результаты удалось получить только при проведении реакции в уксусной кислоте. Использование других растворителей приводило к смеси продуктов. Конденсация фрагментов осуществлялась согласно схеме 1.

Необходимо отметить, что в случае получения фрагментов 1—10 (XIX), 5—10 (IV) (схема 1) и 11—16 (IX) (схема 3) предварительно были синтезированы активированные эфиры пептидов, содержащих на *C*-конце остатки серина и аспарагиновой кислоты, что могло сопровождаться их рацемизацией. Специальное исследование, проведенное с помощью метода ПМР, и анализ гидролизатов методом ГЖХ на оптически активной фазе [6], показали, что синтез идет без заметных признаков рацемизации. Полученные результаты были подтверждены ферментативными методами [7]. Сухой кислотный гидролизат фрагмента растворяли в трис-НСl-буфере (рН 7) и одновременно добавляли оксидазу *L*-аминокислот и каталазу. Смесь инкубировали 120 ч при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты и содержание аминокислот определяли методом ВЭЖХ [8]. При этом наблюдалось постепенное снижение уровня имеющихся аминокислот. Через 120 ч содержание всех аминокислот в гидролизате составляло менее 0,6% исходного уровня. При этом в контрольном эксперименте (в качестве субстратов использовали *D*-Ser и *D*-Asp) в аналогичных условиях изменения концентрации *D*-Ser и *D*-Asp зафиксировано не было. Таким образом, и в данном случае было показано, что рацемизации не происходит.

Активация фрагментов 1—10 (XIX), 5—10 (IV) и 7—10 (III) проводилась с помощью DCC и HONB, при этом контроль за прохождением реакции осуществлялся методом ТСХ. Последующая конденсация с гексапептидом (X) привела к получению защищенных *N*-концевых пептидных фрагментов 1—16 (XX), 5—16 (XII) и 7—16 (XI) (см. схемы 1 и 2).

Структура полученных соединений подтверждена данными ПМР и аминокислотного анализа. Индивидуальность, кроме того, доказана с помощью ТСХ (наличие только одного продукта в трех различных хроматографических системах).

Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия; Fluka, Швейцария). Индивидуальность полученных соединений проверяли методом ТСХ на хроматографических пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системах растворителей: хлороформ — метанол — 32% уксусная кислота, 60 : 45 : 20 (А); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 3 : 1 : 1 (Б); *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 10,5 : 6 : 1 : 7,5 (В); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 45 : 20 : 6 : 11 (Г); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 120 : 20 : 6 : 11 (Д); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 32 : 2 : 1 (Ж); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 9 : 1 : 0,5 (З); бензол — ацетон, 3 : 1 (И); этилацетат (К); этилацетат — гексан, 1 : 1 (Л). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидрина или хлорбензидина. Гидрирование пептидов проводили в присутствии 10% Pd/C фирмы Fluka или Merck. Катализатора брали 5—10% от веса пептида. Приведенные температуры плавления (не скорректированы) определяли на приборе Voetius (ГДР).

Удельное вращение определяли на полириметре Perkin — Elmer (США). Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных в 6 н. HCl с 2% фенола при 110° С в те-

чение 24 ч, проводили на автоматическом анализаторе Labotron Liquimat (ФРГ). Цистеин не определяли.

ВЭЖХ осуществляли на приборе Altex 332 с использованием детектора Altex/Hitachi 155-40 при длине волны 220 нм. Для разделения применяли ацетонитрил (Merck Lichrosolv), воду и трифторуксусную кислоту, трижды перегнанную в стеклянной посуде, KH_2PO_4 (Sigma). Индивидуальность полученных соединений подтверждали спектрами ПМР, снятыми на спектрометре WH-500 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 500 МГц при 37° С. Химические сдвиги в спектрах ПМР измерены относительно внутреннего стандарта 2,2-диметил-2-силанпента-5-сульфоната натрия. Отнесение сигналов в спектрах сделано с помощью двойного резонанса. Образцы для спектров готовили растворением 1 мг соединения в 0,5 мл диметилсульфоксида- d_6 . Органические растворители после экстракции и промывки водой сушили безводным сульфатом натрия. Растворы упаривали на роторном испарителе при 40° С. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40-100 (ЧССР).

Вос-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OH·DCHA (I). 3,51 г (8,3 ммоль) Вос-Ser(Bu^t)-ONB растворяли в 50 мл DMF и к полученному раствору прибавляли раствор 1,35 г (8,3 ммоль) Н-Ser(Bu^t)-ОН в 8,3 мл 1 н. NaOH. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°, после чего упаривали. Остаток обрабатывали 2% H_2SO_4 до pH 2, вынавшее масло экстрагировали эфиром, эфирный раствор промывали водой до нейтральной реакции, сушили, осушитель отфильтровывали, промывали эфиром, к фильтрату добавляли 1,66 мл (8,3 ммоль) дициклогексилamina. Выпавший осадок отфильтровывали. После кристаллизации из гексана получено 4,66 г (97%) соединения (I) с т. пл. 120—127° С. $[\alpha]_D^{25} +25,5^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,87 (Б); 0,78 (В); 0,88 (Г).

Z-Phe-Gly-Gly-OH (II). К суспензии 5,3 г (20 ммоль) Z-Gly-Gly-OH в 100 мл воды прибавляли 20 мл 1 н. NaOH, гидрировали 5 ч в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали до объема ~30 мл, прибавляли 100 мл DMF и 8,4 г (20 ммоль) Z-Phe-ONp. Реакционную смесь перемешивали 15 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в 120 мл воды и дважды экстрагировали эфиром. Водную фракцию подкисляли 2% H_2SO_4 до pH 2, экстрагировали этилацетатом, экстракт промывали водой до нейтрального pH, сушили, упаривали. После кристаллизации из смеси этилацетат — гексан получено 7,0 г (84%) соединения (II) с т. пл. 122—125° С, $[\alpha]_D^{25} -11,8^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,65 (А); 0,67 (Б); 0,62 (Г).

Вос-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-OH (III). 5,00 г (11,9 ммоль) соединения (II) гидрировали 5 ч в 100 мл метанола в присутствии Pd/C. К реакционной смеси добавляли 5,94 мл (11,9 ммоль) 40% раствора тритона В в метаноле (Fluka), катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 60 мл DMF и прибавляли 4,91 г (11,9 ммоль) Вос-Cys(Acm)-ONp. Реакционную смесь выдерживали 15 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в 100 мл воды, дважды экстрагировали эфиром, водную фракцию подкисляли 2% H_2SO_4 до pH 2, экстрагировали этилацетатом. Экстракт промывали водой до нейтрального pH, сушили и упаривали. После кристаллизации из смеси этилацетат — гексан получено 4,60 г (71%) соединения (III) с т. пл. 178—181° С; $[\alpha]_D^{25} +11,9^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,58 (А); 0,54 (I); 0,54 (Б). ПМР (DMSO- d_6 , δ , м. д.): Acm — 8,56 (1H, NH), 4,23, 4,11 (2H, CH₂), 1,83 (3H, CH₃); Cys — 6,91 (1H, NH), 4,15 (1H, α -CH), 2,82, 2,55 (2H, β -CH₂); Phe — 7,91 (1H, NH), 4,50 (1H, α -CH), 3,04, 2,82 (2H, β -CH₂); Gly — 8,34 (1H, NH), 3,76, 3,20 (2H, α -CH₂); Gly — 7,99 (1H, NH), 3,75 (2H, α -CH₂), 1,37 (9H, Вос).

Вос-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-OH (IV). а) 0,55 г (0,94 ммоль) соединения (I) суспендировали в этилацетате и обрабатывали 2% H_2SO_4 . Органический слой промывали водой до нейтрального pH, сушили, упаривали приблизительно до 15 мл, добавляли 0,48 г (1 ммоль) HONB в 10 мл диоксиана, охлаждали до -15° С и при перемешивании добавляли 0,21 г (1 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимида. Реакционную смесь выдерживали 5 ч при 5° С, добавляли 3 капли ледяной уксусной кислоты, через 30 мин выпавшую N,N'-дициклогексимочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 50 мл этилацетата, промывали водой до нейтрального pH, сушили, упаривали и растворяли в 8 мл DMF.

б) 0,57 г (1,05 ммоль) соединения (III) обрабатывали 4 ч 30 мл 85% муравьиной кислоты. Реакционную смесь упаривали, остаток растирали в эфире, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и растворяли в 20 мл воды. Водный раствор обрабатывали дауэком в ацетатной форме, смолу отфильтровывали, промывали водой, объединенные фильтраты упаривали досуха и пересаждали из метанола эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили в вакууме над NaOH. Получали 0,45 г Н-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-OH (IIIa). Раствор 0,24 г (0,5 ммоль) соединения (IIIa) в 8 мл DMF и 0,5 мл 1 н. NaOH прибавляли к раствору, полученному согласно «а». Через 2 ч реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в воде и трижды экстрагировали эфиром. Водный слой подкисляли до pH 2 2% H_2SO_4 , экстрагировали этилацетатом, экстракт промывали водой до нейтрального pH, сушили, упаривали. После кристаллизации из этилацетата получено 0,38 г (88%) соединения (IV) с т. пл. 143—145° С, $[\alpha]_D^{20} -29,4^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,82 (А); 0,62 (Г); 0,59 (Б). Амшинокслотный состав: Ser 1,30 (2); Gly 1,91 (2); Phe 1,00 (1).

Вос-Ile-Gly-ObzI (V). К раствору 3,28 г (20 ммоль) тозилата бензилового эфира глицина в 100 мл DMF при перемешивании прибавляли 2,76 мл (20 ммоль) триэтиламина и 7,01 г (19,9 ммоль) Вос-Ile-ONp. Реакционную смесь выдерживали 48 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в 150 мл этилацетата, промывали 10% раствором аммиака, водой, 2% H_2SO_4 , водой, сушили, упаривали. После кристаллизации из

смеси этилацетат — гексан получено 7,05 г (92%) соединения (V) с т. пл. 93—94° С; $[\alpha]_D^{20}$ —12,7° (с 1, DMF). R_f 0,75 (Ж); 0,69 (И); 0,48 (Л).

Вос-Arg(NO₂)-Ile-Gly-OBzl (VI). 3,78 г (10 ммоль) соединения (V) растворяли в 50 мл трифторуксусной кислоты и выдерживали 1 ч при 20° С. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в смеси изопропиловый спирт — вода (1 : 1), охлаждали до —40° С и обрабатывали дауэксом в ОН⁻-форме до pH 8. Смолу отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток вновь упаривали с изопропиловым спиртом, растворяли в 50 мл DMF, к полученному раствору прибавляли 4,88 г (10 ммоль) *Вос-Arg(NO₂)-OPfp*. Реакционную смесь выдерживали 2 ч при 26° С, упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, последовательно промывали 2% H₂SO₄, водой, 5% NaHCO₃, водой, сушили, упаривали. После кристаллизации из эфира получено 5,41 г (88%) соединения (VI) с т. пл. 104—107° С, $[\alpha]_D^{20}$ —8,9° (с 1, DMF). R_f 0,71 (З); 0,64 (Ж); 0,56 (К).

Z-Ile-Asp(OBu^t)-OH (VII). К раствору 3,40 г (18 ммоль) *H-Asp(OBu^t)-OH* в 18 мл 1 н. NaOH при перемешивании прибавляли раствор 6,6 г (18 ммоль) *Z-Ile-ONp* в 50 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 15 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в воде, дважды экстрагировали эфиром, водный слой подкисляли до pH 2 2% H₂SO₄, экстрагировали этилацетатом, органический слой промывали водой до нейтральной реакции, сушили, упаривали. После кристаллизации из смеси этилацетат — гексан получено 6,90 г (88%) соединения (VII) с т. пл. 135—140° С. $[\alpha]_D^{20}$ —3,6° (с 1, DMF). R_f 0,88 (Г); 0,77 (В); 0,73 (З).

Z-Arg(NO₂)-Ile-Asp(OBu^t)-OH (VIII). 4,36 г (10 ммоль) соединения (VIII) растворяли в 50 мл метанола, прибавляли 5 мл (10 ммоль) 40% раствора тритона В в метаноле и гидрировали 5 ч в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, к остатку прибавляли 50 мл DMF и 5,04 г (10 ммоль) *Z-Arg(NO₂)-OPfp*. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в этилацетате, последовательно промывали 2% H₂SO₄, водой до нейтральной реакции, сушили, упаривали. После кристаллизации из смеси этилацетат — гексан получено 5,00 г (80%) соединения (VIII) с т. пл. 107—110° С; $[\alpha]_D^{20}$ —6,8° (с 1, DMF). R_f 0,87 Б); 0,83 () 0,79 (В).

Z-Arg(NO₂)-Ile-Asp(OBu^t)-Arg(NO₂)-Ile-Gly-OBzl (IX). 1,25 г (2,25 ммоль) соединения (VI) обрабатывали 1 ч 40 мл трифторуксусной кислоты. Упаривали, к остатку добавляли 5 мл 1 н. раствора хлористого водорода в эфире, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе над NaOH. Полученный HCl·*H-Arg(NO₂)-Ile-Gly-OBzl* (0,52 г, 2 ммоль) растворяли в 10 мл DMF, добавляли 0,22 мл (2 ммоль) *N*-метилморфолина и 1,26 г (2 ммоль) соединения (VIII). Реакционную смесь охлаждали до 0° С, добавляли 2,29 г (3 ммоль) «комплекса F» и оставляли при 20° С на 12 ч. Выпавшую *N,N'*-дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток обрабатывали 100 мл этилацетата. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, сушили в вакууме. После кристаллизации из этилацетата получено 1,63 г (74%) соединения (IX) с т. пл. 204—208° С, $[\alpha]_D^{20}$ —13,0° (с 1, DMF). R_f 0,68 (Ж); 0,45 (З); 0,54 (К).

H-Arg-Ile-Asp(OBu^t)-Arg-Ile-Gly-OH (X). 1,54 г (1,4 ммоль) соединения (IX) гидрировали 3 ч в 20 мл ледяной уксусной кислоты в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, оставшееся масло растворяли в изопропиловом спирте и вновь упаривали. Остаток пересаждали из изопропилового спирта эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, сушили в вакууме над NaOH. Получено 1,1 г (95%) соединения (X) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D^{20}$ —14,6° (с 1, DMF). R_f 0,37 (А); 0,24 (Б); 0,42 (В). Аминокислотный состав: Asp 1,01 (1); Gly 1,03 (1); Ile 1,91 (2); Arg 2,05 (2). PMP(DMSO-*d*₆, δ, м. д.): Arg — 3,88 (1H, α-CH), 1,66 (2H, β-CH₂); Ile — 8,45 (1H, NH), 4,26 (1H, α-CH), 1,69 (1H, β-CH); Asp — 8,43 (1H, NH), 4,60 (1H, α-CH), 2,65, 2,44 (2H, β-CH₂); Arg — 7,87 (1H, NH), 4,32 (1H, α-CH), 1,49, 1,65 (2H, β-CH₂); Ile — 7,88 (1H, NH), 4,18 (1H, α-CH), 1,72 (1H, β-CH₂); Gly — 8,21 (1H, NH), 3,77, 3,66 (2H, CH₂); 1,35 (9H, Bu^t).

Вос-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp(OBu^t)-Arg-Ile-Gly-OH (XI). а) 0,97 г (1,75 ммоль) соединения (III) растворяли в 15 мл DMF, добавляли 0,41 г (2,27 ммоль) HONB, охлаждали до —30° С и при перемешивании добавляли 0,41 г (1,92 ммоль) *N,N'*-дициклогексилкарбодимид. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при —10° С, 2 ч при 4° С, 10 ч при 20° С. Выпавшую *N,N'*-дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали, оставшееся масло растворяли в 30 мл этилацетата и осаждали гексаном. Выпавший осадок отфильтровывали, пересаждали из изопропилового спирта эфиром, сушили в вакууме. Получали 0,90 г (72%) *Вос-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-ONB* (IIIб).

б) 0,72 г (1 ммоль) соединения (IIIб), полученного согласно «а», растворяли в 10 мл DMF и добавляли 0,79 г (1 ммоль) соединения (X). Реакционную смесь перемешивали 5 ч при 20° С, добавляли 100 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, экстрагировали горячим этилацетатом, отфильтровывали, сушили в вакууме. Получено 1,22 г (92%) соединения (XI) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D^{20}$ —17,2° (с 1, DMF). R_f 0,79 (А); 0,25 (Б); 0,62 (В). Аминокислотный состав: Asp 1,01 (1); Gly 3,00 (3); Ile 1,75 (2); Phe 1,07 (1); Arg 2,05 (2).

Вос-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp(OBu^t)-Arg-Ile-Gly-OH (XII). 0,28 г (0,33 ммоль) соединения (IV) растворяли в 5 мл DMF, добавляли 0,08 г

(0,43 ммоль) HONB, охлаждали до -30°C и при перемешивании добавляли 0,08 г (0,36 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимида. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -10°C , затем 2 ч при 4°C и 10 ч при 20°C . Выпавшую N, N'-дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток обрабатывали 60 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили и растворяли в 5 мл DMF. К полученному раствору добавляли 0,26 г (0,33 ммоль) соединения (X). Реакционную смесь перемешивали 4 ч при 20°C , добавляли 70 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакууме. Получено 0,42 г (77%) соединения (XII) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D^{20} -6,4^{\circ}$ (с 1, DMF). R_f 0,79 (A); 0,34 (B); 0,69 (B). Аминокислотный состав: Asp 0,93 (1); Ser 1,92 (2); Gly 3,00 (3); Ile 1,86 (2); Phe 1,04 (1); Arg 2,02 (2).

Z-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OH·DCHA (XIII). 1,61 г (10 ммоль) H-Ser(Bu^t)-OH растворяли в 15 мл метанола, к полученному раствору прибавляли 5 мл (10 ммоль) 40% раствора тритона В в метаноле, упаривали. Остаток растворяли в 50 мл DMF, к полученному раствору прибавляли 4,56 г (10 ммоль) Z-Ser(Bu^t)-ONB. Реакционную смесь выдерживали 15 ч при 20°C , упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, промывали 2% H₂SO₄, затем водой до нейтральной реакции, упаривали. Оставшееся масло растворяли в 30 мл эфира и добавляли 2 мл (10 ммоль) DCHA. Через 15 ч выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали эфиром, сушили. Получено 5,2 г (81%) соединения (XIII) с т. пл. $127-132^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} +28,3^{\circ}$ (с 1, DMF). R_f 0,71 (Ж).

Z-Arg(NO₂)-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OH (XIV). Суспензию 6,35 г (10 ммоль) соединения (XIII) в 300 мл этилацетата обрабатывали 2% H₂SO₄, промывали водой до нейтрального pH, упаривали, остаток растворяли в 150 г этанола и гидрировали в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток вновь упаривали с изопропиловым спиртом. Остаток растворяли в 50 мл DMF и прибавляли 5,18 г (10 ммоль) Z-Arg(NO₂)-OPfp. Через 4 ч реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 50 мл этилацетата и осаждали диизопропиловым эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали диизопропиловым эфиром, сушили. Получено 6,11 г (91%) соединения (XIV) с т. пл. $103-104^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} +16,0^{\circ}$ (с 1, DMF). R_f 0,82 (A); 0,42 (Ж).

H-Arg-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OH (XV). 6,0 г (8,9 ммоль) соединения (XIV) гидрировали в 70 мл 90% уксусной кислоты в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 50 мл воды и обрабатывали дауэксом в OH⁻ форме до pH 10. Смолу отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток вновь упаривали с изопропиловым спиртом, растворяли в этаноле и осаждали этилацетатом. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, сушили. Получено 3,6 г (84%) соединения (XV) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D^{20} +30,4^{\circ}$ (с 1, DMF). R_f 0,50 (A); 0,27 (B); 0,44 (B).

Z-Arg(NO₂)-Arg-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OH (XVI). 2,38 г (5 ммоль) соединения (XV) растворяли в 30 мл DMF, к полученному раствору добавляли 2,59 г (5 ммоль) Z-Arg(NO₂)-OPfp. Реакционную смесь выдерживали 4 ч при 20°C , упаривали, остаток растворяли в 35 мл хлороформа и наносили на колонку (2,5 × 40 см) с силикагелем. Колонку последовательно промывали 600 мл хлороформа и далее градиентно увеличивали содержание метанола в хлороформе от 0 до 100% (общий объем градиента 2 л). Фракции, соответствующие основному продукту, объединяли, упаривали. Остаток переосаждали из метанола этилацетатом. Выпавший осадок отфильтровывали, сушили. Получено 3,50 г (86%) соединения (XVI) с т. пл. $157-162^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} +30,0^{\circ}$ (с 1, DMF). R_f 0,65 (A); 0,44 (B).

Z-Leu-Arg-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OH (XVII). 3,5 г (4,2 ммоль) соединения (XVI) гидрировали 5 ч в 90 мл 80% уксусной кислоты. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 100 мл воды и обрабатывали дауэксом в OH⁻ форме до pH 10. Смолу отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток вновь упаривали с изопропиловым спиртом. Масло растворяли в 50 мл DMF, к полученному раствору прибавляли 1,64 г (4,2 ммоль) Z-Leu-ONp. Реакционную смесь выдерживали 15 ч при 20°C , упаривали, остаток растворяли в 40 мл хлороформа и наносили на колонку (2,5 × 40 см) с силикагелем. Колонку последовательно промывали хлороформом (300 мл), смесью хлороформ — метанол, 1 : 1 (800 мл), продукт элюировали 1% уксусной кислоты в метаноле. Фракции, соответствующие основному продукту, объединяли, упаривали, остаток растворяли в 25 мл метанола и осаждали этилацетатом. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, сушили. Получили 2,50 г (70%) соединения (XVII) с т. пл. $162-165^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} +2,0^{\circ}$ (с 0,6, DMF). R_f 0,52 (A); 0,41 (B); 0,71 (B).

Woc-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OH (XVIII). 1,76 г (2 ммоль) соединения (XVII) гидрировали 5 ч в 40 мл 80% уксусной кислоты в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 50 мл воды и обрабатывали дауэксом в OH⁻ форме до pH 10. Смолу отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток вновь упаривали с изопропиловым спиртом. Оставшееся масло растворяли в 20 мл DMF, к полученному раствору прибавляли 0,87 г (2 ммоль) Woc-Ser(Bu^t)-ONB. Реакционную смесь выдерживали 15 ч при 20°C , упаривали, остаток растворяли в 25 мл смеси хлороформ — метанол, 9 : 1, наносили на колонку (2,5 × 40 см) с силикагелем и промывали последовательно 300 мл смеси хлороформ — метанол, 1 : 1, и далее 1% раствором уксусной кислоты в метаноле. Фракции, соответствующие основному продукту, объединяли, упаривали, остаток переосаждали из

метанола этилацетатом. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, сушили. Получено 1,62 г (79%) соединения (XVIII) с т. пл. 169—173° С, $[\alpha]_D^{20} +2,8^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,48 (А); 0,36 (Б); 0,64 (В). Аминокислотный состав: Ser 2,87 (3); Leu 0,98 (1); Arg 1,92 (2). ПМП (DMSO- d_6 , δ , м.д.): Ser — 6,76 (1H, NH), 4,01 (1H, α -CH), 3,43 (2H, β -CH₂); Leu — 7,80 (1H, NH), 4,38 (1H, α -CH), 1,42 (2H, β -CH₂); Arg — 8,25 (1H, NH), 4,25 (1H, α -CH), 1,58, 1,87 (2H, β -CH₂); Arg — 7,95 (1H, NH), 4,38 (1H, α -CH), 1,54, 1,72 (2H, β -CH₂); Ser — 8,47 (1H, NH) 4,20 (1H, α -CH), 3,56, 3,73 (2H, β -CH₂); Ser — 7,37 (1H, NH), 3,72 (1H, α -CH), 3,59, 3,52 (2H, β -CH₂); 1,06, 1,09, 1,12 (3с, 27H, Bu^t), 1,38 (с, 9H, Boc).

Boc-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Arg-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-OH (XIX). а) К раствору 0,52 г (0,5 ммоль) соединения (XVIII) в 5 мл NMF прибавляли 0,18 г (1 ммоль) HONB и 0,16 г (1 ммоль) бромгидрата пиридина. Смесь охлаждали до -30° С и прибавляли раствор 0,13 г (0,61 ммоль) N, N'-дициклогексилкарбодимиды в 1 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -30° С, 15 ч при 4° С, 20 ч при 20° С. Добавляли 100 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, сушили, растворяли в 5 мл DMF.

б) 0,27 г (0,5 ммоль) соединения (III) обрабатывали идентично описанному для получения соединения (IV) согласно «б». Полученный раствор прибавляли к раствору, полученному по пункту «а».

Реакционную смесь перемешивали 15 ч при 20°, прибавляли 0,5 мл 1 н. HCl и 60 мл этилацетата, выпавший осадок отфильтровывали и вновь переосаждали из DMF этилацетатом. Полученный продукт подвергали очистке на колонке (1,6 × 25 см) с силикагелем RP₁₈ (7,5 мкм), используя градиент от 0,1% водной трифторуксусной кислоты к метанолу. Скорость элюции 10 мл/мин. Фракции, соответствующие основному продукту реакции, объединяли, упаривали. После переосаждения из метанола этилацетатом, получено 0,44 г (54%) соединения (XIX) в виде аморфного порошка. R_f 0,51 (А); 0,31 (Б); 0,61 (В). Аминокислотный состав: Ser 2,56 (3); Gly 2,04 (2); Arg 1,98 (2); Phe 0,93 (1); Leu 0,97 (1).

Boc-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Arg-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp(OBu^t)-Arg-Ile-Gly-OH (XX). К раствору 0,20 г (0,14 ммоль) соединения (XIX) в 5 мл DMF прибавляли 0,05 г (0,28 ммоль) HONB, реакционную смесь охлаждали до -30° С и прибавляли 0,03 г (0,14 ммоль) N, N'-дициклогексилкарбодимиды. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -30° С, 36 ч при 20° С. К реакционной смеси прибавляли 60 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 5 мл DMF и прибавляли 0,12 г (0,14 ммоль) соединения (X). Реакционную смесь перемешивали 15 ч при 20° С, разбавляли 50 мл этилацетата, выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, сушили в вакууме. Получено 0,29 г (94%) соединения (XX) в виде аморфного порошка. R_f 0,39 (А). Аминокислотный состав: Asp 0,98 (1); Ser 2,63 (3); Gly 3,02 (3); Ile 1,97 (2); Leu 0,95 (1); Phe 0,92 (1); Arg 3,90 (4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников М. В., Беспалова Ж. Д., Молокоедов А. С., Ревенко И. В., Сепетов Н. Ф., Исакова О. Л., Титов М. И. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 759—767.
2. Schwyzer R., Iselin B., Kappeler H., Riniker B., Rittel W., Luber H. // Helv. chim. acta. 1963. V. 46. № 6. P. 1975—1996.
3. Wunsch E., Drees F. // Chem. Ber. 1966. B. 99. S. 110—118.
4. Bajusz S., Lazar T., Paulau Z. // Acta chim. Acad. sci. hung. 1964. V. 41. № 3. P. 329—336.
5. McFadden P. N., Clarke S. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 25. P. 11503—11511.
6. Витт С. В., Мяжкова М. А., Сапоровская М. Б., Никитина С. Б., Великов В. М. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 2. С. 154—157.
7. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965. С. 779—780.
8. Benson J. R., Hare P. E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 2. P. 619—622.

Поступила в редакцию
20.X.1987

ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDES. II. SYNTHESIS OF N-TERMINAL FRAGMENTS

OVCHINNIKOV M. V., BESPALOVA Z. D., MOLOKOEDOV A. S., REVENKO I. V.,
SEPETOV N. F., ISAKOVA O. L.,
TITOV M. I.

All-Union Cardiology Research Centre,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

N-terminal fragments of atrial natriuretic peptides have been synthesized by classical methods of peptide chemistry in solution and characterized by various physico-chemical methods. The choice of the scheme and methods of synthesis is discussed.