



УДК 577.112.6

© 1990 г.

*Ш. Х. Халиков, А. Н. Шахматов, М. И. Исмоилов***СИНТЕЗ 17-ЧЛЕННОГО ПЕПТИДА (143—159) —
ФРАГМЕНТА БЕЛКА VP₁ ВИРУСА ЯЩУРА A₁₂****II *. КОНДЕНСАЦИЯ ФРАГМЕНТОВ***Таджикский государственный университет им. В. И. Ленина,
Душанбе*

Конденсацией методом смешанных ангидридов синтезированных ранее фрагментов получен 17-членный пептид аминокислотной последовательности (143—159) белка VP₁ вируса ящура A₁₂. К N-концу полученных пептидов был присоединен остаток норлейцина, выполняющий роль метки. Полное отщепление защитных групп осуществляли гидрированием хлоргидратов пептидов. Свободные пептиды очищали ВЭЖХ.

В предыдущем сообщении [1] был описан синтез фрагментов (143—145), (146—148), (149—152), (153—155) и (156—159) 17-членного пептида, соответствующего части белка VP₁ вируса ящура A₁₂. В настоящей работе приводится описание конденсации полученных фрагментов (схема), которую осуществляли методом смешанных ангидридов. Данный метод позволяет получить продукты с высоким выходом и образованием меньшего количества побочных продуктов, чем, например, при использовании карбодимидного метода.

Из пяти конденсируемых фрагментов два (143—145 и 146—148) в качестве C-концевого остатка имеют глицин, еще два (156—159 и 149—152) — пролин и один (153—155) — аланин. Таким образом, наибольшая опасность рацемизации существует для конденсации фрагмента (153—155) с фрагментом (156—159) и степень рацемизации может оказаться значительной при неблагоприятных условиях течения реакции [2, 3].

Имеющуюся опасность рацемизации уменьшали путем соблюдения по возможности «условий Андерсона» [4]. Для этого реакцию проводили при достаточно низкой температуре (от -25 до -15° С), уменьшали время образования активированного компонента до 3—5 мин и, кроме того, применяли слабое основание — N-метилморфолин. Однако плохая растворимость одного или обоих исходных компонентов, а также полученных продуктов реакции ограничивала применение тетрагидрофурана в качестве растворителя, и поэтому реакции образования смешанного ангидрида и конденсации проводили в диметилформамиде.

Следует отметить, что хорошие и удовлетворительные выходы продуктов конденсации блоков достигались постепенным увеличением избытка карбоксильного компонента по мере увеличения числа аминокислотных остатков в аминокислотах. Например, в случае получения 7-членного пептида (153—159) (I) избыток карбоксильного компонента составлял 10—20%, а в случае последовательного синтеза 11-, 14-, 17-членных пептидов (соответственно пептиды (III), (V) и (VII)) — 50, 50—60 и 100% соответственно. 17-Членный пептид (VII) получался с более низким выходом, чем другие продукты блочной конденсации. В свою очередь получение 17-членного пептида (VII) по другой схеме путем конденсации методом смешанных ангидридов фрагментов (143—148) Boc-Val-Arg(NO₂)-Gly-

* Сообщение 1 см. [1]. Сокращения: HOvt — 1-гидроксибензотриазол, Nle — норлейцин.

Asp(OBu^t)-Phe-Gly-OCH₃ (IX) и (149—159) (III), а также карбодимидным методом с применением добавки HOBT не дало удовлетворительных результатов.

Поскольку 17-членные и промежуточные пептиды после их конъюгирования с различными носителями предназначались для дальнейших иммунологических исследований, мы получили N-норлейциновые производные этих пептидов. Наличие в пептидах остатков Nle облегчает определение степени их конъюгирования с природными носителями*. Эти норлейциновые производные получали путем конденсации методом смешанных ангидридов Вос-Nle-OH с хлоргидратами 7, 11, 14, 17 и 6-членных пептидов: Вос-Nle-(153—159) (II), Вос-Nle-(149—159) (IV), Вос-Nle-(146—159) (VI), Вос-Nle-(143—159) (VIII), Вос-Nle-(143—148) (X).

Увеличение выходов продуктов конденсации достигалось путем применения 100%-ного избытка карбоксильного компонента, а также более 2 экв. нуклеофильной добавки — HOBT по видоизмененной методике [5]. Целью применения последнего реагента было уменьшение образования побочных продуктов уретанового типа путем превращения смешанного ангидрида в 1-гидроксизенотриазоловый эфир карбоксильного компонента *in situ* в процессе конденсации.

Все полученные пептиды (кроме пептидов (143—148) и (Nle-143—148)) плохо растворяются в таких растворителях, как эфир, этилацетат, хлороформ. Они мало растворимы в ацетоне и метаноле, но хорошо растворимы в DMF, смеси хлороформ — метанол (содержащей 10% и более метанола), горячей CH₃COOH, а пептиды (143—159) и (Nle-143—159) растворимы также в смеси метанол — вода (содержащей 20—50% воды).

Поэтому синтезированные пептиды невозможно было очистить от исходных веществ обычным приемом (промыванием растворов реакционной смеси кислотами и основными реагентами). Поэтому очистку труднорастворимых пептидов от исходных амино- и карбоксильного компонента, а также некоторых побочных продуктов реакции осуществляли с помощью ионообменников. Для этого сначала из хлороформ-метанольного (1 : 1) или диметилформамидного раствора реакционной смеси удаляли карбоксильный компонент (если его невозможно удалить переосаждением) и HCl из оставшегося хлоргидрата N-метилморфолина действием ионообменной смолы Амберлит IRA-401 (OH⁻-форма), затем аминокислотный и оставшийся N-метилморфолин удаляли действием ионообменной смолы дауэкс-50W (H⁺-форма). Дополнительную очистку проводили путем переосаждения продуктов из хлороформ-метанольного раствора этилацетатом или ацетоном. Поскольку с увеличением молекулярной массы аминокислотного и карбоксильного компонентов их удаление ионообменниками замедлялось, приходилось применять новые порции последнего или использовать колонночную хроматографию на силикагеле (например, в случае пептидов (149—159) и (Nle-149—159)).

С помощью ТСХ обнаружилось, что в процессе конденсации блоков методом смешанных ангидридов образуется небольшое количество побочных продуктов, которые очень близки по хроматографической подвижности к основным. Хотя образовавшиеся побочные продукты трудно обнаружить в защищенных пептидах, их, если они образовались в достаточном количестве, легко можно заменить после процедуры снятия защитных групп в смеси хлоргидратов.

Такие образовавшиеся побочные продукты в нашем случае были окончательно удалены на последней стадии с помощью полупрепаративной ВЭЖХ.

Временные Вос-группы удаляли действием раствора HCl в уксусной кислоте или этилацетате на раствор защищенных пептидов в ледяной CH₃COOH (кроме пептида (143—148)). В присутствии OBU^t-эфирной группы Вос-защиту удаляли действием муравьиной кислоты по видоизмененной методике [6].

Полное деблокирование всех пептидов осуществляли каталитическим

* Результаты этих исследований будут опубликованы отдельно.

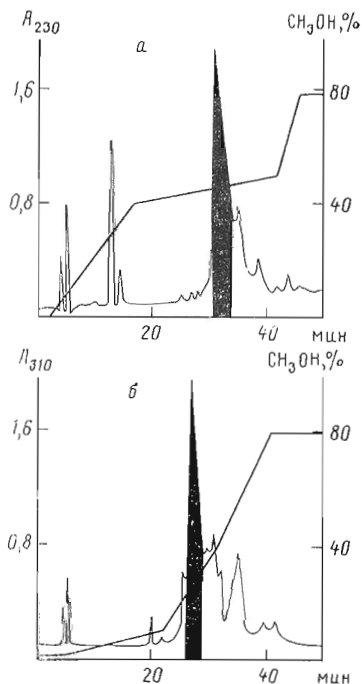


Рис. 1

Рис. 1. Разделение полностью деблокированных пептидов (II) (а) и (VII) (б) (соответственно пептиды (XII) и (XVIII)) с использованием ВЭЖХ на колонке (5 мм \times 250 мм). Градиент концентрации метанола в 0,2% CF_3COOH . Скорость элюции 2 мл/мин. Масса разделяемой пробы 7—10 мг. Отмечена выделяемая фракция

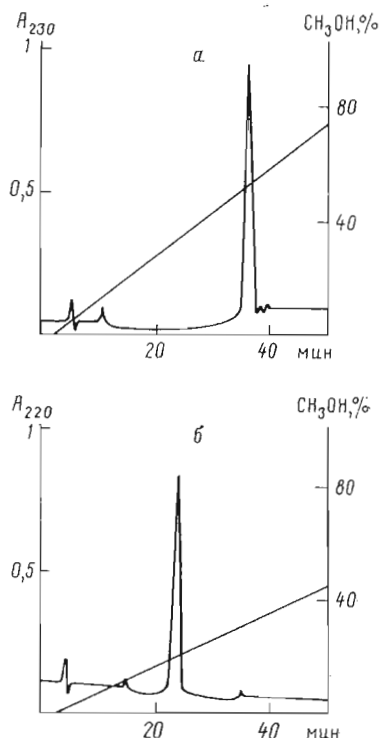


Рис. 2

Рис. 2. Аналитическая ВЭЖХ выделенных (см. рис. 1) пептидов (XII) (а) и (XVII) (б). Условия см. рис. 1

гидрированием в токе водорода их хлоргидратов в смеси метанол — муравьиная кислота (1 : 1) или уксусной кислоте в присутствии Pd/C. Реакция гидрирования больших пептидов протекала медленно и не до конца. Поэтому, чтобы реакция протекала более чем на 80% в течение 7 сут, необходимо было менять катализатор 2—3 раза. Предварительную очистку продуктов гидрирования проводили переосаждением из метанола эфиром или этилацетатом. Затем очистку пептидов осуществляли ВЭЖХ на полу-препаративной обращенно-фазовой колонке при градиенте метанола в 0,2% CF_3COOH (рис. 1, 2).

Поскольку в нашем случае хлоргидраты аргининсодержащих пептидов оказались лучше растворимыми в воде, чем формиаты, все синтезированные пептиды были превращены в хлоргидраты. Аминокислотный анализ полученных пептидов соответствовал их составу.

В заключение необходимо отметить, что ход реакции конденсации, процесс снятия Вос-защиты с пептидов, а также ход гидрирования контролировались ТСХ на пластинках «Силуфол». В качестве проявителя использовался Cl_2 — бензидин — KI-тест [7], который, как известно, намного чувствительнее, чем общеизвестная нингидриновая реакция, и доступнее, чем флуорескампновый [8], ИК-спектроскопический и дансильный методы [9], особенно для длинных пептидов. Поэтому этот тест позволяет обнаруживать незначительные количества примесей, не обнаруживаемых с помощью нингидрина. Окончательные выводы о чистоте пептидов делались по ТСХ на пластинках «Merck».

С целью проведения иммунологических исследований деблокированные пептиды (153—159) (XI), (149—159) (XIII), (146—159) (XV) и (143—148) (XIX) были конъюгированы с синтетическим полиэлектролитом-

иммуностимулятором (ПЭ) — сополимером N-винилпирролидона и акриловой кислоты.

Индукцию гуморального иммунного ответа изучали на мышах СВА × × С₅₇ ВL/6/F₁. Животных иммунизировали конъюгатами пептидов с поли-электролитом, свободными пептидами в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ) и свободными пептидами в физиологическом растворе. Реиммунизацию проводили на 28-е сут свободными гомологичными пептидами в физиологическом растворе в дозе 10 мкг пептида на мышь. Исследование иммунного ответа проводили методом иммуноферментного анализа, определяя уровни антипептидных антител в сыворотках крови животных. Анализ полученных при этом результатов показал, что однократная иммунизация изолированными пептидами не обеспечивала существенного уровня антипептидных антител. Титры антител при повторной иммунизации неконъюгированными пептидами в таких группах животных соответствовали фоновому уровню контрольных, неиммунизированных животных 1 : 100 — 1 : 160. Введение свободных пептидов в ПАФ с повторной иммунизацией свободными пептидами значительно усиливало иммунный ответ на пептиды (титры антител 1 : 160 — 1 : 320), а иммунизация мышей конъюгатами пептидов с ПЭ значительно усиливала его. Титры антипептидных антител значительно превышали таковые в группах животных, иммунизированных неконъюгированными пептидами. Повторная иммунизация свободными пептидами (149—159), (146—159) и (143—148) после иммунизации соответствующими конъюгатами вызывала образование высоких уровней антипептидных антител (титры 1 : 768, 1 : 1024 и 1 : 1536 соответственно). Повторная иммунизация свободным пептидом (153—159) животных, иммунизированных соответствующим конъюгатом, не вызывала индукции иммунного ответа, уровень которого незначительно отличался от такового в группах контрольных животных (титры антител 1 : 256). Предварительные результаты исследования иммунологических свойств некоторых синтезированных пептидов и их конъюгатов с ПЭ были сообщены ранее в краткой форме [10, 11]. Подробное описание иммунологических исследований будет предметом отдельной публикации.

Экспериментальная часть

В работе использовался Вос-L-Nle-OH·DCNA (Reanal). Индивидуальность полученных соединений проверяли методом ТСХ на хроматографических пластинках Silufol UV₂₅₁ (ЧСФР) и Kieselgel-60 на стеклянной подложке № 5724 (Merck, ФРГ) в следующих системах: хлороформ — метанол — циклогексан, 70 : 15 : 15 (А); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 18 : 2 : 1 (Б); втор-бутанол — пиридин — вода, 100 : 45 : 5 (В); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Г); пиридин — уксусная кислота — вода — этилацетат, 20 : 6 : 11 : 90 (Д); *n*-бутанол — вода — пиридин — уксусная кислота, 30 : 24 : 20 : 6 (Е); хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 50 : 10 : 5 : 1 (Ж); хлороформ — метанол — вода — уксусная кислота, 12 : 9 : 3 : 2 (З). Вещества обнаруживали с помощью Cl₂-бензидин-К1. Гидрирование проводили в присутствии Pd/C (Merck) (5 и 10% по весу). Удельное оптическое вращение определяли на поляриметре Polamat (ГДР), температуру плавления — на приборе Voetius (ГДР). Аминокислотный анализ осуществляли на приборах Hitachi-635 (Япония) и Biotronic-5001 (ФРГ) после гидролиза в 6 н. HCl с 2% фенола при 105—110° С в течение 24 ч. ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex-340 (Beckman, США) с использованием обращенно-фазной колонки Ultrasphere (5 мкм, 10 × 250 мм) и детектора Spectroflow-757 (Kratos, США). В работе использовали силикагель L-100/160 (Chemapol, ЧСФР), амберлит IRA-401 и дауэкс-50W × 8 (100—200 меш; США).

Растворители удаляли на роторном испарителе при 40—50° С (если не указана температура).

Woc-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (I). К охлажденному до —25° С раствору 1,66 г (3,4 ммоль) *Woc-Arg(NO₂)-Val-Ala-OH* [1] в 25 мл DMF, содержащего 0,38 мл (3,4 ммоль) *N*-метилморфолина, при энергич-

ном перемешивании добавляли 0,445 мл (3,4 ммоль) изобутилхлорформата и через 3 мин 2,32 г (3,4 ммоль) $\text{HCl} \cdot \text{H-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Gln-Leu-Pro-OBzl}$ в 30 мл DMF, содержащего 0,38 мл (3,4 ммоль) *N*-метилморфолина. Перемешивание продолжали 1 ч при $-25-15^\circ \text{C}$, 1 ч при $-15-0^\circ \text{C}$, 3 ч при 20°C и оставляли на ночь. После этого добавляли 1 мл H_2O , удаляли растворитель, остаток растворяли в ацетоне и разбавляли эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, водой, 5% уксусной кислотой и снова водой. Осадок растворяли в смеси хлороформ — метанол (1 : 1), добавляли 5 г дауэкса-50W (H^+ -форма), перемешивали 30 мин, фильтровали и фильтрат упаривали. Остаток растворяли в смеси хлороформ — метанол (4 : 1) и переосаждали эфиром. Выход продукта (I) 2,33 г (61,5%). Т. пл. $167-169^\circ \text{C}$. R_f 0,32 (A), 0,62 (Г), 0,49 (Д), 0,86 (Ж). $[\alpha]_D^{20} -58,06^\circ$ (с 1, $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, 4 : 1).

HCl-H-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (Ia). 1,43 г (1,28 ммоль) соединения (I) растворяли в 10 мл уксусной кислоты и добавляли 10 мл 3 н. HCl в уксусной кислоте. Смесь выдерживали 30 мин при 20°C . Растворитель удаляли при 20°C , остаток растворяли в 10 мл уксусной кислоты и разбавляли эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, ацетоном, переосаждали из DMF этилацетатом. Выход продукта (Ia) 1,29 г (95,7%). R_f 0,46 (B), 0,18 (Г), 0,45 (Ж). $[\alpha]_D^{20} -35,84^\circ$ (с 1, DMF).

Boc-Nle-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (II). 160 мг (0,39 ммоль) $\text{Boc-Nle-OH} \cdot \text{DCHA}$ освобождали от DCHA в 10 мл метанола действием дауэкса-50 W (H^+ -форма) [12]. Полученный Boc-Nle-OH растворяли в 3 мл DMF, добавляли 0,044 мл (0,39 ммоль) *N*-метилморфолина, охлаждали до $-30 \div -25^\circ \text{C}$. При энергичном перемешивании добавляли 0,05 мл (0,39 ммоль) изобутилхлорформата и выдерживали при этой температуре 5 мин. Добавляли охлажденный раствор 2,10 мг (0,2 ммоль) соединения (Ia) в 5 мл DMF, содержащего 0,023 мл (0,20 ммоль) *N*-метилморфолина и 62 мг (0,46 ммоль) HOBT . Перемешивание продолжали 3 ч при $-25 \div -10^\circ \text{C}$, 4 ч при 20°C , растворитель упаривали, остаток переосаждали из DMF эфиром. После повторного переосаждения из DMF этилацетатом осадок растворяли в DMF, добавляли 1 г амберлита IRA-401 (OH^- -форма). Перемешивали 1 ч, анионит отфильтровывали, к фильтрату добавляли 1 г дауэкса-50 W (H^+ -форма) и перемешивали 1 ч. Катионит отфильтровывали, фильтрат упаривали до 3—4 мл и разбавляли эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали эфиром. Выход продукта (II) 230 мг (93,9%). R_f 90,33 (A), 0,62 (Г). $[\alpha]_D^{20} -38,52^\circ$ (с 1, $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, 4 : 1).

HCl-H-Nle-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (IIa). 210 мг (0,17 ммоль) соединения (II) растворяли в 10 мл муравьиной кислоты и выдерживали 1 ч при 20°C . Добавляли 3 мл 3 н. HCl в этилацетате. Растворитель упаривали. Остаток сначала переосаждали из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) этилацетатом, затем ацетоном. Выход продукта (IIa) 190 мг (95,4%). Т. пл. $203-209^\circ \text{C}$, R_f 0,50 (B), 0,35 (Г), 0,60 (E), 0,47 (Ж). $[\alpha]_D^{20} -43,87^\circ$ (с 1, DMF — HCOOH , 1 : 1).

Boc-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (III). 1,13 г (1,49 ммоль) $\text{Boc-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-OH} \cdot \text{DCHA}$ [1] суспендировали в 100 мл этилацетата и встряхивали в делительной воронке с 17 мл 1 н. H_2SO_4 . Органический слой отделяли, промывали водой, сушили MgSO_4 . Сушитель отфильтровывали и фильтрат упаривали. Полученный $\text{Boc-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-OH}$ растворяли в 8,5 мл THF, добавляли 0,167 мл (1,49 ммоль) *N*-метилморфолина и охлаждали до -25°C . При перемешивании к полученной смеси добавляли 0,195 мл (1,49 ммоль) изобутилхлорформата, выдерживали 4,5 мин при -25°C и добавляли охлажденный раствор 1,35 г (1,28 ммоль) соединения (Ia) в 15 мл DMF, содержащего 0,144 мл (1,28 ммоль) *N*-метилморфолина. Далее реакцию проводили и обрабатывали реакционную смесь согласно методике получения пептида (I). Выход продукта (III) 1,2 г (59,5%). R_f 0,34 (A), 0,75 (Ж). $[\alpha]_D^{20} -52,30^\circ$ (с 1, $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, 4 : 1).

В случае применения 30% избытка карбоксильного компонента выход продукта (III) 70%.

HCl·H-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (IIIa). 1,1 г (0,7 ммоль) соединения (III) растворяли в 10 мл уксусной кислоты, добавляли 10 мл 3 н. HCl в уксусной кислоте и выдерживали 30 мин при 20° С. Растворитель упаривали при 20° С и остаток растворяли в 10 мл системы Г. Полученный раствор наносили на колонку (2,5 × 20 см) с силикагелем, уравновешенным хлороформом. Сначала осуществляли элюирование смесями хлороформ — метанол — циклогексан, 70 : 15 : 15 (50 мл), 65 : 15 : 15 (30 мл), 60 : 15 : 15 (30 мл), 50 : 15 : 15 (30 мл), затем смесями хлороформ — метанол, 4 : 1 (50 мл), 3 : 1 (50 мл), 2 : 1 (30 мл), 1 : 1 (50 мл), контроль вели по ТСХ. Собирали фракции, содержащие побочный продукт, и отдельно основное вещество. Фракции, содержащие основной продукт, объединяли, упаривали и остаток пересаждали из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) эфиром. Выход продукта (IIIa) составил 900 мг (85,7%). R_f 0,58 (В), 0,40 (Г), 0,66 (Е), 0,44 (Ж). $[\alpha]_D^{20}$ —52,34° (с 1, DMF).

Вос-Nle-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (IV) получали аналогично соединению (II) из 180 мг (0,44 ммоль) Вос-Nle-ОН·DCHA и 300 мг (0,2 ммоль) соединения (IIIa) в 5 мл DMF, содержащего 0,023 мл (0,2 ммоль) N-метилморфолина. После первичного пересаждения из смеси CHCl₃—CH₃ОН (4 : 1) эфиром осадок растворяли в 5 мл системы В, добавляли 5 мл хлороформа. Полученный раствор наносили на колонку (2,5 × 20 см) с силикагелем, уравновешенным хлороформом. Колонку сначала элюировали смесями хлороформ — метанол — циклогексан, 170 : 15 : 15 (20 мл), 150 : 15 : 15 (20 мл), 140 : 15 : 15 (20 мл), 120 : 15 : 15 (20 мл), 110 : 15 : 15 (20 мл), 100 : 15 : 15 (20 мл), 90 : 15 : 15 (30 мл), 80 : 15 : 15 (30 мл), 70 : 15 : 15 (30 мл), затем смесями хлороформ — метанол, 4 : 1 (50 мл), 1 : 1 (50 мл), 1 : 9 (50 мл). Собирали фракции, содержащие основной продукт (контроль ТСХ). Объединенные фракции упаривали, остаток кристаллизовали из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) эфиром. Выход продукта (IV) 220 мг (65,7%). R_f 0,35 (А), 0,13 (Б), 0,96 (В), 0,84 (Ж). $[\alpha]_D^{20}$ —39,61 (с 1, CHCl₃—CH₃ОН, 4 : 1).

HCl·H-Nle-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (IVa) получали аналогично соединению (IIa) из 220 мг (0,13 ммоль) соединения (IV). Продукт пересаждали из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) ацетоном. Выход пептида (IVa) составил 180 мг (85,3%). R_f 0,57 (В), 0,41 (Г), 0,12 (Д), 0,67 (Е), 0,46 (Ж). $[\alpha]_D^{20}$ —50,10° (с 1, CHCl₃—CH₃ОН, 4 : 1).

Вос-Asp(OBzl)-Phe-Gly-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (V) получали аналогично пептиду (I) из 330 мг (0,62 ммоль) Вос-Asp(OBzl)-Phe-Gly-ОН [1], 600 мг (0,4 ммоль) соединения (IIIa). После первичной очистки путем пересаждения и обработки ионообменниками продукт растворяли в 5 мл системы Г, добавляли 5 мл хлороформа и наносили на колонку (2,5 × 20 см) с силикагелем, уравновешенным хлороформом. Элюцию вели сначала смесями хлороформ — уксусная кислота, 35 : 2 : 1 (100 мл), 33 : 2 : 1 (70 мл), 28 : 2 : 1 (50 мл), 23 : 2 : 1 (50 мл), 18 : 2 : 1 (50 мл), 13 : 2 : 1 (50 мл), 8 : 2 : 1 (30 мл), затем системой А (100 мл) и смесью хлороформ — метанол, 4 : 1 (100 мл). Собирали фракции, содержащие основной продукт (контроль ТСХ). Объединенные фракции упаривали при 20° С, остаток пересаждали из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) эфиром. Выход продукта (V) 590 мг (75%). R_f 0,34 (А), 0,15 (Б), 0,58 (Г). $[\alpha]_D^{20}$ —35,3° (с 1, CHCl₃—CH₃ОН, 4 : 1).

HCl·H-Asp(OBzl)-Phe-Gly-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (Va) получали аналогично соединению (IIIa) из 590 мг (0,3 ммоль) соединения (V) в присутствии 2 мл анизола. Продолжительность реакции 40 мин. После пересаждения из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) продукт растворяли в 5 мл системы Г, разбавляли хлороформом до объема 10 мл. Полученный раствор наносили на

колонку (2,5 × 20 см) с силикагелем, уравновешенным хлороформом, элюировали сначала смесями хлороформ — метанол — уксусная кислота, 60 : 2 : 1 (50 мл), 50 : 2 : 1 (20 мл), 40 : 1 : 1 (20 мл), 30 : 2 : 1 (20 мл), 18 : 2 : 1 (50 мл), затем системой А (50 мл) и смесями хлороформ — метанол, 4 : 1 (50 мл), 1 : 1 (100 мл). Собирали фракции, содержащие основной продукт (контроль по ТСХ), объединяли их и упаривали. Остаток пересаждали из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) эфиром. Выход продукта (Va) 550 мг (96,5%). R_f 0,68 (B), 0,48 (Г), 0,67 (E), 0,58 (Ж). $[\alpha]_D^{20}$ —51,66° (с 1, CHCl₃ — CH₃OH, 4 : 1).

Woc-Nle-Asp(OBzl)-Phe-Gly-Ser-(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (VI) получали аналогично соединению (II) из 110 мг (0,27 ммоль) Woc-Nle-OH·DCHA и 220 мг (0,11 ммоль) соединения (Va) в 6 мл DMF, содержащего 0,013 мл (0,11 ммоль) N-метилморфолина и 40 мг (0,30 ммоль) НОВт. После обычной очистки с помощью ионообменников основной продукт пересаждали из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) вначале эфиром, затем дважды этилацетатом. Общий выход продукта (VI) 190 мг (79,16%). R_f 0,35 (A), 0,17 (B), 0,54 (D), 0,86 (Ж). $[\alpha]_D^{20}$ —35,04° (с 1, CHCl₃ — CH₃OH, 4 : 1).

HCl-H-Nle-Asp(OBzl)-Phe-Gly-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (VIa) получали аналогично соединению (IIa) из 180 мг (0,086 ммоль) соединения (VI) в присутствии 1 мл анизол. Продукт очищали пересаживанием сначала из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) эфиром, этилацетатом, затем из муравьиной кислоты ацетоном. Выход продукта (VIa) 150 мг (86,2%). R_f 0,63 (B), 0,48 (Г), 0,18 (D), 0,58 (Ж). $[\alpha]_D^{20}$ —44,16° (с 1, CHCl₃ — CH₃OH, 4 : 1).

Woc-Val-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-Gly-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (VII). К охлажденному до —25°С раствору 100 мг (0,21 ммоль) Woc-Val-Arg(NO₂)-Gly-OH [1] в 5 мл DMF, содержащего 0,023 мл (0,2 ммоль) N-метилморфолина, при перемешивании добавляли 0,027 мл (0,2 ммоль) изобутилхлорформата, через 5 мин охлажденный раствор 280 мг (0,15 ммоль) соединения (Va) в 5 мл DMF, содержащего 0,017 мл (0,15 ммоль) N-метилморфолина и 43 мг (0,32 ммоль) НОВт. Реакционную смесь перемешивали 4 ч при —25 ÷ —10°С, 1 ч при —10—20°С и 6 ч при 20°С. Растворитель упаривали. Остаток пересаждали из метанола эфиром. Полученный осадок отфильтровывали, промывали эфиром, растворяли в смеси хлороформ — метанол (1 : 1). К полученному раствору добавляли 2 г амберлита IRA-401 (ОН⁻-форма) и перемешивали 1 ч. Анионит отфильтровывали, к фильтрату добавляли 2 г дауэкса-50 W (H⁻-форма), перемешивали 30 мин. Катионит отфильтровывали и фильтрат упаривали. Остаток 4 раза пересаждали из горячего метанольного раствора ацетоном. Выход продукта (VII) 220 мг (64,5%). R_f 0,27 (A), 0,91 (B), 0,55 (Г), 0,34 (D). $[\alpha]_D^{20}$ —49,47° (с 0,84, DMF — H₂O, 5 : 1).

HCl-H-Val-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-Gly-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (VIIa). К раствору 210 мг (0,09 ммоль) соединения (VII) в 5 мл уксусной кислоты, содержащему 1 мл анизол, добавляли 10 мл 3 н. HCl в этилацетате и смесь выдерживали 1 ч при 20°С. Раствор упаривали при 20°С, остаток пересаждали один раз из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) этилацетатом и дважды из DMF ацетоном. Выход продукта (VIIa) 170 мг (83,3%). R_f 0,35 (Г), 0,45 (Ж). $[\alpha]_D^{20}$ —58,99° (с 1, CHCl₃ — CH₃OH, 4 : 1).

Woc-Nle-Val-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-Gly-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (VIII) получали аналогично соединению (II) из 60 мг (0,15 ммоль) Woc-Nle-OH·DCHA и 130 мг (0,057 ммоль) соединения (VIIa). После удаления DMF из реакционной смеси остаток растворяли в 100 мл этилацетата и добавляли 10 мл 5% уксусной кислоты. Через 30 мин выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом. Осадок растворяли в минимальном количестве DMF, повторяли обработку этилацетатом и 5% уксусной кислотой и дважды пересаждали из DMF ацетоном. Выход продукта (VIII) 120 мг

(85,7%). R_f 0,29 (А), 0,91 (В), 0,57 (Г), 0,37 (Д), 0,93 (Ж). $[\alpha]_D^{20}$ $-47,0^\circ$ (с 1, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CH}_3\text{COOH}$, 16 : 5 : 4).

HCl-Nle-Val-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-Gly-Ser(Bzl)-Leu-Ala-Pro-Arg(NO₂)-Val-Ala-Arg(NO₂)-Gln-Leu-Pro-OBzl (VIIa) получали аналогично соединению (Va) из 120 мг (0,05 ммоль) соединения (VIII). Растворитель удаляли при 20° С, остаток переосаждали из муравьиной кислоты ацетоном. Выход продукта (VIIa) 111 мг (94%). R_f 0,58 (В), 0,41 (Г), 0,54 (Ж). $[\alpha]_D^{20}$ $-77,43^\circ$ (с 1, $\text{CH}_3\text{OH} - \text{HCOOH}$, 1 : 1).

Woc-Val-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBu^t)-Phe-Gly-OCH₃ (IX). а) 1,15 г (2,26 ммоль) *Woc-Asp(OBu^t)-Phe-Gly-OCH₃* растворяли в смеси 10 мл муравьиной кислоты, 3 мл *тrem*-бутанола, 2 мл анизолы и выдерживали 1 ч при 20° С, 1,5 ч при 45—50° С. Растворитель удаляли при 20° С, остаток сушили под вакуумом при 50° С. Полученный стекловидный продукт растворяли в 4 мл DMF, добавляли 0,25 мл (2,23 ммоль) *N*-метилморфолина и охлаждали до -25° С.

б) К охлажденному до -25° С раствору 0,90 г (1,9 ммоль) *Woc-Val-Arg(NO₂)-Gly-OH* в 5 мл DMF, содержащему 0,21 мл (1,9 ммоль) *N*-метилморфолина, при перемешивании добавляли 0,24 мл (1,8 ммоль) изобутилхлорформиата. Через 5 мин к полученному раствору добавляли раствор, полученный по методике «а», продолжали перемешивать 3 ч при $-25 \div -10^\circ$ С, 2 ч при 20° С и оставляли на ночь при 20° С. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 200 мл этилацетата в присутствии 10 мл воды. Органическую фазу промывали 0,4 М лимонной кислотой, водой, 0,5 М NaHCO_3 и снова водой. Этилацетатный раствор сушили над MgSO_4 , осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали и остаток перекристаллизовывали из ацетона. Общий выход продукта (IX) 0,71 г (43,77%). Т. пл. 176—179° С. R_f 0,43 (А), 0,89 (В), 0,76 (Д). $[\alpha]_D^{20}$ $-35,18^\circ$ (с 1, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 4 : 1).

Woc-Val-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBu^t)-Phe-Gly-OH (IXa). К раствору 0,76 г (0,88 ммоль) соединения (IX) в смеси 12,5 мл метанола, 4 мл ацетона добавляли при перемешивании двумя порциями за 1 ч при 20° С 4 мл (2 ммоль) 0,5 М K_2CO_3 и перемешивали еще 3 ч. Растворитель удаляли при 20° С. Остаток обрабатывали 3 мл метанола, разбавляли ацетоном и охлаждали. Выпавший хлопьевидный осадок отфильтровывали и промывали ацетоном. Осадок растворяли в 10 мл воды, прибавляли 5 мл метанола, к полученному раствору добавляли дауэкс-50W (H^+ -форма) до получения слабокислой среды. Перемешивали 30 мин, затем катионит отфильтровывали, фильтрат упаривали, а остаток переосаждали из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) эфиром. Выход продукта (IXa) 0,57 г (76,30%). Т. пл. 157—158° С. R_f 0,15 (А), 0,10 (Б), 0,83 (Г), 0,055 (Д), 0,67 (Ж). $[\alpha]_D^{20}$ $-19,28^\circ$ (с 1, CH_3OH).

Woc-Nle-Val-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBu^t)-Phe-Gly-OCH₃ (X). а) 0,21 г (0,24 ммоль) соединения (IX) растворяли в смеси 8 мл *тrem*-бутанола, 13 мл муравьиной кислоты, 2 мл анизолы и выдерживали 2,5 ч при 20° С. Растворитель удаляли при 20° С, остаток переосаждали из смеси *тrem*-бутанол — муравьиная кислота (8 : 2) эфиром. Выпавший гелеобразный осадок отфильтровывали и промывали эфиром. Полученный продукт растворяли в 6 мл DMF, добавляли 0,046 мл (0,4 ммоль) *N*-метилморфолина и охлаждали до -25° С.

Полученный раствор вводили в реакцию с *Woc-Nle-OH* (0,46 ммоль), как это описано при получении соединения (II).

После перемешивания в течение 3 ч при $-25 \div -10^\circ$ С, 2 ч при 20° С растворитель упаривали, к остатку добавляли 150 мл этилацетата и 10 мл воды. Перемешивали 30 мин, выпавший осадок отфильтровывали, промывали уксусной кислотой, водой, 0,5 н. NaHCO_3 , водой и сушили под вакуумом. Получено 30 мг соединения (X). Этилацетатный фильтрат промывали 0,4 М лимонной кислотой, водой, 0,5 н. NaHCO_3 , водой, сушили и упаривали. Остаток дважды переосаждали из этилацетата эфиром. Полученный осадок объединяли с порцией осадка и переосаждали из смеси хлороформ — метанол (4 : 1) эфиром. Общий выход продукта

(X) 74 мг (36,62%). R_f 0,48 (A), 0,76 (B), 0,78 (D). $[\alpha]_D^{20}$ $-37,68^\circ$ (с 1, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 4 : 1).

Boc-Nle-Val-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBu^t)-Phe-Gly-OH (Xa) получали аналогично соединению (IXa) из 70 мг (0,07 ммоль) соединения (X) в 10 мл метанола действием 2 мл (1 ммоль) 0,5 М K_2CO_3 в течение 3,5 ч. Катионы K^+ удаляли действием 2 г дауэкса-50 W (H^+ -форма). Продукт перекристаллизовали из метанола. Выход продукта (Xa) 55 мг (79,71%), R_f 0,42 (B), 0,67 (Г), 0,54 (E). $[\alpha]_D^{20}$ $-22,37^\circ$ (с 1, $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$, 1 : 1).

3HCl·H-Arg-Val-Ala-Arg-Gln-Leu-Pro-OH (XI). 174 мг (0,16 ммоль) соединения (Ia) растворяли в 10 мл уксусной кислоты и гидрировали в токе водорода в присутствии катализатора (Pd/C) в течение 72 ч (контроль по ТСХ). Катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали, остаток переосаждали из метанола эфиром. Осадок растворяли в 0,2% трифторуксусной кислоте и очищали с помощью ВЭЖХ. Фракции, соответствующие основному пику, лиофильно сушили, лиофилизат растворяли в 2 мл метанола, добавляли 1 мл 3 н. HCl в этилацетате и растворители упаривали при 20°C . Полученный хлоргидрат пептида переосаждали из метанола эфиром. Выход продукта (XI) 129 мг (82,7%). Т. пл. $137 - 138^\circ\text{C}$. R_f 0,47 (E), 0,68 (З). $[\alpha]_D^{20}$ $-52,05^\circ$ (с 1, CH_3OH). Аминокислотный анализ: Val 1,00 (1), Arg 1,95 (2), Leu 0,98 (1), Ala 0,96 (1), Pro 1,24 (1), Glu 1,16 (1).

3HCl·H-Nle-Arg-Val-Ala-Arg-Gln-Leu-Pro-OH (XII). 190 мг (0,16 ммоль) соединения (IIa) гидрировали 7 сут в 20 мл смеси метанол — муравьиная кислота (1 : 1). Катализатор заменяли на 4-е сут. После удаления катализатора и упаривания растворителя остаток переосаждали из метанола этилацетатом. Осадок растворяли в 0,2% растворе трифторуксусной кислоты и очищали с помощью ВЭЖХ (см. рис. 1, 2). Основные фракции элюата лиофилизовали. Остаток растворяли в 10 мл метанола и действием 2 мл 3 н. HCl в этилацетате превращали в хлоргидрат. Выход продукта (XII) 148 мг (85,74%). R_f 0,47 (E), 0,70 (З). $[\alpha]_D^{20,5}$ $-126,65^\circ$ (с 1, CH_3OH). Аминокислотный анализ: Nle 0,81 (1), Val 1,06 (1), Arg 1,76 (2), Leu 1,11 (1), Ala 1,00 (1), Pro 0,91 (1), Glu 0,75 (1).

3HCl·H-Ser-Leu-Ala-Pro-Arg-Val-Ala-Arg-Gln-Leu-Pro-OH (XIII) получали аналогично соединению (XII) гидрированием 150 мг (0,1 ммоль) пептида (IIIa) в 20 мл смеси метанол — муравьиная кислота (1 : 1) в течение 7 сут. Катализатор меняли на 3-и и 5-е сут. Выход продукта (XIII) 68,6 мг (52,76%). R_f 0,58 (E), 0,75 (З). $[\alpha]_D^{20,5}$ $-187,92^\circ$ (с 1, CH_3OH). Аминокислотный анализ: Val 1,00 (1), Arg 2,07 (2), Ser 0,93 (1), Leu 2,20 (2), Ala 1,96 (2), Pro 2,22 (2), Glu 1,19 (1).

3HCl·H-Nle-Ser-Leu-Ala-Pro-Arg-Val-Ala-Arg-Gln-Leu-Pro-OH (XIV) получали аналогично соединению (XII) гидрированием 180 мг (0,11 ммоль) пептида (IVa) в 15 мл смеси метанол — муравьиная кислота (1 : 1) в течение 7 сут. Катализатор меняли на 4-е и 6-е сут. Выход 67 мг (42,20%). R_f 0,58 (E), 0,75 (З). $[\alpha]_D^{20}$ $-47,89^\circ$ (с 1, $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, 4 : 1). Аминокислотный анализ: Nle 0,75 (1), Val 1,02 (1), Arg 1,72 (2), Ser 0,71 (1), Leu 2,25 (2), Ala 2,00 (2), Pro 1,74 (2), Glu 0,75 (1).

3HCl·H-Asp-Phe-Gly-Ser-Leu-Ala-Pro-Arg-Val-Ala-Arg-Gln-Leu-Pro-OH (XV) получали аналогично соединению (XIV) из 170 мг (0,09 ммоль) соединения (Va) с выходом 79,5 мг (54,29%). R_f 0,75 (З). $[\alpha]_D^{20}$ $-39,37^\circ$ (с 0,21, CH_3OH). Аминокислотный анализ: Val 1,00 (1), Arg 1,75 (2), Gly 1,11 (1), Asp 0,97 (1), Phe 0,74 (1), Ser 0,78 (1), Leu 1,79 (2), Ala 2,08 (2), Pro 2,00 (2), Glu 1,98 (1).

3HCl·H-Nle-Asp-Phe-Gly-Ser-Leu-Ala-Pro-Arg-Val-Ala-Arg-Gln-Leu-Pro-OH (XVI) получали аналогично соединению (XII) из 150 мг (0,07 ммоль) пептида (VIa) с выходом 75,9 мг (61,62%). R_f 0,76 (З). $[\alpha]_D^{20}$ $-101,18^\circ$ (с 1, CH_3OH). Аминокислотный анализ: Nle 0,77 (1), Val 1,04 (1), Arg 1,74 (2), Gly 0,87 (1), Asp 0,86 (1), Phe 0,92 (1), Ser 0,71 (1), Leu 2,25 (2), Ala 2,0 (2), Pro 1,78 (2), Glu 0,73 (1).

4HCl·H-Val-Arg-Gly-Asp-Phe-Gly-Ser-Leu-Ala-Pro-Arg-Val-Ala-Arg-Gln-Leu-Pro-OH (XVII) получали аналогично соединению (XIV) из 100 мг (0,04 ммоль) пептида (VIIa). Катализатор меняли трижды. Выход 38 мг (43,70%). R_f 0,59 (E), 0,78 (З). $[\alpha]_D^{21} -58,075^\circ$ (с 1, CH₃OH). Аминокислотный анализ: Val 1,67 (2), Arg 2,67 (3), Gly 2,00 (2), Asp 1,02 (1), Phe 0,92 (1), Ser 0,87 (1), Leu 1,67 (2), Ala 1,89 (2), Pro 2,29 (2), Glu 1,02 (1).

4HCl·H-Nle-Val-Arg-Gly-Asp-Phe-Gly-Ser-Leu-Ala-Pro-Arg-Val-Ala-Arg-Gln-Leu-Pro-OH (XVIII) получали аналогично соединению (XVII) из 111 мг (0,05 ммоль) пептида (VIIIa) с выходом 47 мг (48,47%). R_f 0,59 (E), 0,78 (З). $[\alpha]_D^{20} -74,21^\circ$ (с 1, CH₃OH). Аминокислотный анализ: Nle 0,78 (1), Val 2,02 (2), Arg 2,78 (3), Gly 2,00 (2), Asp 0,97 (1), Phe 0,95 (1), Ser 0,91 (1), Leu 1,98 (2), Ala 2,05 (2), Pro 2,20 (2), Glu 1,05 (1).

2HCl·H-Val-Arg-Gly-Asp-Phe-Gly-OH (XIX). 170 мг (0,2 ммоль) пептида (IXa) гидрировали в 20 мл муравьиной кислоты в течение 2 сут. Катализатор отфильтровывали, к фильтрату добавляли 1 мл 3 н. HCl в уксусной кислоте. Через 20 мин растворитель упаривали при 20° С. Остаток переосаждали из метанола эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром. Осадок растворяли в 0,2% трифторуксусной кислоте и очищали методом ВЭЖХ. Фракции, содержащие основную продукт, лиофилизировали. Продукт растворяли в 5 мл метанола, добавляли 1 мл 3 н. HCl в этилацетате и упаривали. Остаток переосаждали из метанола эфиром. Выход продукта (XIX) 112,5 мг (78,12%). R_f 0,43 (E), 0,54 (З). $[\alpha]_D^{20} -2,74^\circ$ (с 1, CH₃OH). Аминокислотный анализ: Val 1,00 (1), Arg 1,03 (1), Gly 2,37 (2), Asp 1,14 (1), Phe 1,01 (1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Халиков Ш. Х., Исмаилов М. И., Шахматов А. Н. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1477—1487.
2. Kovacs J., Kalita C., Chatak V. K. // J. Org. Chem. 1972. V. 37. № 1. P. 30—34.
3. Zahn H., Meienhofer J., Schnabel E. // Acta chim. Acad. sci. hung. 1965. V. 44. № 1—2. P. 109—128.
4. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1967. V. 89. № 19. P. 5012—5017.
5. Anderson G. W., Callahan F. M., Zimmerman J. E. // J. Amer. Chem. Soc. 1967. V. 89. № 1. P. 178.
6. Helpern B., Nitecki D. E. // Tetrahedron Lett. 1967. № 31. P. 3031—3033.
7. Хроматография на бумаге. Пер. с чешского. М.: ИЛ, 1962. С. 271.
8. Stephens R. E. // Anal. Biochem. 1978. V. 84. № 1. P. 116—126.
9. Юнг Р., Медведкин В. Н., Митин Ю. В. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1474—1480.
10. Эйвазови Э. Р., Халиков Ш. Х., Некрасов А. В., Борисова В. П., Исмаилов М. И., Шахматов А. Н. // Интерполимерные комплексы. Тез. докл. 2-й Всесоюз. конф. Рига, 1989. С. 164.
11. Eivasova E. R., Khalikov S. Kh., Nekrasov A. V., Borisova V. N., Ismailov M. I., Shahmatov A. N. // Abstract second Cuban and international Seminar of biotechnology. Havana, Cuba. 17—22 april. 1989. X05—043.
12. Коломейцева Л. А., Гурин С. К., Груздев В. С., Рябцев М. Н., Повоселов В. А., Бруценцев И. А., Швачкин Ю. П. Способ получения N^α-Вос-аминокислот: А. с. 332077 СССР / Б. И. 1972. № 10.

Поступила в редакцию
20.I.1989

После доработки
16.IV.1990

**SYNTHESIS OF HEPTADECAPETIDE (143—159), A FRAGMENT
OF VP₁ PROTEIN OF A₁₂ FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS**

II. CONDENSATION OF FRAGMENTS

V. I. Lenin Tajik State University, Dushanbe

A 17-membered peptide corresponding to the amino acid sequence of (143—159) site of protein VP₁ of A₁₂ foot-and-mouth disease virus has been obtained by mixed anhydride method condensations of the earlier synthesized fragments. A norleucine residue has been attached, as a label, to the ends of peptides obtained. The complete deprotection was performed by hydrogenation peptides' hydrochlorides and the products were purified by HPLC. The antigenic properties of the synthesized peptides are discussed.