



УДК 547.964.4.07

## ПРИРОДНЫЕ ПЕПТИДЫ И ИХ АНАЛОГИ

XXIII. СИНТЕЗ СОМАТОСТАТИНА БЕЗ ЗАЩИТЫ ГИДРОКСИЛЬНЫХ ГРУПП  
В ОСТАТКАХ ОКСИАМИНОКИСЛОТ*Швачкин Ю. П., Гириш С. К., Смирнова А. П.,  
Шишкина А. А., Ермак Н. М.**Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Осуществлен полный химический синтез соматостатина по новой схеме, обеспечивающей возможность использования производных оксиаминокислот (Thr<sup>10</sup>, Thr<sup>12</sup> и Ser<sup>13</sup>) без защиты гидроксильных групп. Синтетический соматостатин получен в аналитически чистом состоянии и не отличается по физико-химическим и биологическим свойствам от природного гормона.

Гормон соматостатин представляет собой тетрадекапептид строения (I) [1] (здесь и далее все асимметрические аминокислоты принадлежат к стереическому *L*-ряду). В настоящее время этот гормон привлекает пристальное внимание экспериментаторов и клиницистов. Несмотря на появление ряда публикаций о синтезе соматостатина в растворе [2–6] и на полимерных носителях [8–11], задача разработки препаративного синтеза соматостатина по-прежнему остается весьма актуальной.

В связи с изучением препаративного метода получения соматостатина мы осуществили полный химический синтез этого гормона по новой схеме, представленной ниже. Синтез соматостатина (I) проведен блочным способом, исходя из фрагментов 1–7 и 8–14 (см. схему).

Отличительными особенностями этой схемы синтеза являются: 1) использование производных всех оксиаминокислот (Thr<sup>10</sup>, Thr<sup>12</sup> и Ser<sup>13</sup>) без защиты гидроксильных групп; 2) применение тетрагидропиранильных грушировок для защиты сульфгидрильных групп в остатках Cys<sup>3</sup> и Cys<sup>14</sup> на промежуточных стадиях синтеза [7].

Получение защищенного линейного тетрадекапептида (XI) стыковкой двух гептапептидных фрагментов представляется наиболее предпочтительным с точки зрения тактики пептидного синтеза, так как в этих условиях целевое соединение максимально отличается по свойствам от исходных веществ. Благодаря этому выделение образующегося тетрадекапептида из реакционной смеси существенно облегчается.

При синтезе фрагментов использовали как метод ступенчатого наращивания пептидной цепи на один аминокислотный остаток (фрагменты 1–3, 4–7, 8–12), так и метод блочной конденсации (фрагменты 1–7, 8–14) (см. схему).

Приятые сокращения: Nps – *o*-нитрофенилсульфенил-, OPfr – пентафторфениловый эфир, Thr – тетрагидропиранил-, ONp – *o*-нитрофениловый эфир.

При реализации рассматриваемой схемы синтеза реакции конденсации проводили в условиях, сводящих возможность рацемизации отдельных аминокислотных остатков к минимуму. Ключевые стадии стыковки фрагментов осуществляли азидным методом или методом активированных (пентафторфениловых) эфиров.

Выбор защитных групп определялся условием сведения к минимуму нежелательных побочных реакций при удалении  $N^{\alpha}$ -защитных группировок на промежуточных стадиях синтеза.

Для защиты  $\alpha$ -аминогрупп применяли *трет*-бутилоксикарбонильную или *о*-нитрофенилсульфенильную группу. Карбоксильные группы в *С*-концевых аминокислотных остатках отдельных фрагментов защищали либо этерификацией (метиловые и бензиловые эфиры), либо солеобразованием. Для защиты  $\epsilon$ -аминогрупп в остатках Lys<sup>4</sup> и Lys<sup>9</sup> использовали бензилоксикарбонильную группу.

Применение производных всех оксиаминокислот, входящих в молекулу соматостатина (Thr<sup>10</sup>, Thr<sup>12</sup> и Ser<sup>13</sup>), без защиты гидроксильных групп позволило сократить число отдельных стадий, снизить трудоемкость и тем самым повысить эффективность синтеза в целом, что особенно важно при получении гормона в препаративном масштабе.

Для исключения нежелательных реакций *О*-ацилирования остатков оксиаминокислот фрагмент 8—14 синтезировали не по ранее описанной схеме 6+1 [7], а по схеме 5+2. Благодаря этому число стадий конденсации с участием не защищенного по гидроксилу остатка Ser<sup>13</sup>, более склонного к побочным реакциям *О*-ацилирования [12], удалось сократить с семи до трех. Кроме того, учитывая результаты ранее проведенных в нашей лаборатории кинетических исследований [12—14], указанные выше оксиаминокислоты с незащищенными гидроксильными группами вводили в реакции пептидного синтеза в условиях, обеспечивающих подавление нежелательных реакций *О*-ацилирования, а именно: при минимальных избытках основания [12], в среде диметилформамида [13] и в форме пентафторфениловых эфиров [14].

При синтезе фрагмента 1—7 исходными веществами являлись метиловый эфир фенилаланина, *трет*-бутилоксикарбонилфенилаланин, *n*-нитрофениловый эфир  $N^{\alpha}$ -*трет*-бутилоксикарбониласпарагина, *n*-нитрофениловый эфир  $N^{\alpha}$ -*трет*-бутилоксикарбонил- $N^{\epsilon}$ -бензилоксикарбониллизина, метиловый эфир *S*-тетрагидропиранилцистеина, бензиловый эфир глицина и *трет*-бутилоксикарбонилаланин. Синтез фрагмента 1—7 в виде защищенного гептапептидгидраза (II) подробно описан ранее [7].

При синтезе фрагмента 8—14 исходными веществами служили *S*-тетрагидропиранилцистеин, пентафторфениловый эфир *N*-*трет*-бутилоксикарбонилсерина, метиловый эфир треонина, пентафторфениловый эфир *трет*-бутилоксикарбонилфенилаланина, пентафторфениловый эфир *N*-*трет*-бутилоксикарбонилтреонина, пентафторфениловый эфир  $N^{\alpha}$ -*трет*-бутилоксикарбонил- $N^{\epsilon}$ -бензилоксикарбониллизина, пентафторфениловый эфир  $N^{\alpha}$ -*трет*-бутилоксикарбонилтриптофана, пентафторфениловый эфир  $N^{\alpha}$ -(*о*-нитрофенилсульфенил)триптофана и пентафторфениловый эфир *N*-(*о*-нитрофенилсульфенил)серина. Промежуточными соединениями являлись метиловый эфир *трет*-бутилоксикарбонилфенилаланилтреонина (III), соответствующий дипептид со свободной аминогруппой (IIIa), метиловый эфир *N*-*трет*-бутилоксикарбонилтреонил-фенилаланил-треонина (IIIб), соответствующий трипептид со свободным карбоксилем (IV), полностью деблокированный трипептид (IVa),  $N^{\alpha}$ -*трет*-бутилоксикарбонил- $N^{\epsilon}$ -бензилоксикарбониллизил-треонил-фенилаланил-треонин (V), частично защищенные пентапептиды (VI) и (VIa), пентафторфениловые эфиры пентапептидов (VII) и (VIIa), *N*-*трет*-бутилоксикарбонилсерил-*S*-тетрагидропиранилцистеин (VIII), *N*-(*о*-нитрофенилсульфенил)серил-*S*-тетрагидропиранилцистеин (VIIIa), соответствующий дипептид со свободной аминогруппой



(VIIIб), частично защищенные гептапептиды (IX) и (IXа), а также гептапептид со свободной  $\alpha$ -аминогруппой (X).

Синтез защищенных дипептидов (VIII, VIIIа) вызвал у нас некоторые трудности, обусловленные плохой растворимостью исходного S-тетрагидропиранилицистеина в органических растворителях. Для перевода этого соединения в растворимое состояние приходилось применять водные системы растворителей и вводить значительный избыток основания. Реакция конденсации S-тетрагидропиранилицистеина с пентафторфениловыми эфирами производных серина в таких жестких условиях сопровождалась образованием некоторого количества побочных соединений (в основном *трет*-бутилоксикарбонилсерина и *о*-нитрофенилсульфенилсерина), что снижало выход целевого защищенного дипептида. Специальная серия опытов показала, что оптимальными условиями проведения реакции конденсации является применение в качестве реакционной среды смеси диметилформид — вода и использование в качестве основания гидроокиси натрия. Образующиеся N-защищенные дипептиды (VIII, VIIIа) оказалось удобно выделять и очищать в виде соответствующих дидциклогексиламмониевых солей.

При отщеплении *трет*-бутилоксикарбонильной группы от защищенного дипептида (VIII) действием трифторуксусной кислоты или раствора хлористого водорода в диоксане наблюдалось образование небольшого количества побочных соединений, обусловленное лабильностью S-тетрагидропиранильной группы в данных конкретных условиях. Деблокирование соответствующего *о*-нитрофенилсульфенильного производного (VIIIа) при действии разбавленного раствора хлористого водорода в диоксане проходило очень быстро и не сопровождалось образованием каких-либо побочных соединений. По этим причинам мы использовали *о*-нитрофенилсульфенильную группу наряду с *трет*-бутилоксикарбонильной для защиты остатка Trp<sup>8</sup>.

В результате азидной конденсации гептапептида (II), соответствующего фрагменту 1—7, с частично защищенным гептапептидом (X), соответствующим фрагменту 8—14, был получен частично защищенный тетрадекапептид (XI). Последний обрабатывали бромистым водородом в трифторуксусной кислоте. При использованной комбинации защитных групп это обеспечивало исчерпывающее снятие их с защищенного тетрадекапептида в одну рабочую стадию. В качестве протекторов применяли добавки анизола и  $\beta$ -меркаптоэтанола.

Образование дисульфидного мостика между остатками Cys<sup>3</sup> и Cys<sup>14</sup> проводили на последней стадии синтеза, подвергая деблокированный линейный тетрадекапептид (XII) окислению кислородом воздуха при pH 6,9.

Выделение образовавшегося соматостатина (I) из реакционной смеси осуществляли распределительной хроматографией на колонке с сефадексом G-25 в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). В результате синтетический соматостатин (I) получен в аналитически чистом состоянии и по своим константам и биологической активности\* не отличается от природного гормона, а также от препаратов синтетического соматостатина, полученных в нашей лаборатории ранее [7].

### Экспериментальная часть

Тонкослойную хроматографию всех соединений, кроме соматостатина (I), проводили на стандартных пластинках «Силуфол UV<sub>254</sub>» (Kavalier, ЧССР). Для хроматографии соматостатина (I) применяли стеклянные пластинки с тонким слоем силикагеля марки LS<sub>5/10</sub> (Chemapol, ЧССР). Использовали следующие системы растворителей: хлороформ — метанол, 20 : 1 (А); хлороформ — метанол, 10 : 1 (Б); хлороформ — метанол, 6 : 1

\* Оценка биологической активности синтетического соматостатина проведена в лаборатории биологической стандартизации гормонов под руководством доктора медицинских наук В. П. Федотова.

(В); бензол — метанол, 10 : 1 (Г); хлороформ — уксусная кислота, 8 : 1 (Д); хлороформ — уксусная кислота — метанол, 26 : 1 : 2 (Е); хлороформ — муравьиная кислота — метанол, 14 : 1 : 1 (Ж); хлороформ — муравьиная кислота — метанол, 40 : 1 : 2 (И); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (К); изопропанол — 1 н. водный аммиак, 2 : 1 (Л); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5 (М); уксусная кислота — бензол, 1 : 20 (Н); петролейный эфир — хлороформ, 1 : 2 (Р). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью пингидрина либо обработкой хроматограмм парами иода.

Для аминокислотного анализа пептиды подвергали кислотному гидролизу в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 110°С, 20 ч), после чего количественное содержание аминокислот в гидролизатах определяли с помощью автоматического аминокислотного анализатора типа TSM (Technicon, США).

Цистеинсодержащие пептиды перед кислотным гидролизом обрабатывали надмуравьиной кислотой [11].

Измерения оптической активности исследуемых соединений выполняли на поляриметре типа MA-510-0 (Hilger-Watts, Англия).

*Вос-Phe-Thr-OMe* (III). К раствору 2,7 г (20 ммоль) метилового эфира треонина в 20 мл тетрагидрофурана прибавляли 9,2 г (21 ммоль) пентафторфенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонилфенилаланина и перемешивали 15 мин при 25°С. Затем реакционную смесь упаривали в вакууме и остаток перекристаллизовывали из смеси диизопропиловый эфир — петролейный эфир (2 : 1). Получили 7,5 г (97%) дипептида (III) в виде бесцветных кристаллов с т. пл. 129—131°С,  $R_f$  0,75 (А), 0,55 (Г), 0,75 (Д),  $[\alpha]_D^{24} -11,3^\circ$  (*c* 2,0; CH<sub>3</sub>OH). Найдено, %: С 60,13; Н 7,38; N 7,49. C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>. Вычислено, %: С 59,99; Н 7,42; N 7,36.

*Вос-Thr-Phe-Thr-OH* (IV). Растворили 3,8 г (10 ммоль) соединения (III) в 7 мл 4 н. раствора хлористого водорода в диоксане и выдерживали 90 мин при 20°С, затем прибавляли 200 мл эфира, образовавшийся осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме. Получили 3,2 г (100%) хлоргидрата метилового эфира фенилаланилтреонина (IIIа), который использовали для дальнейшего синтеза без дополнительной очистки. Полученное соединение (IIIа) растворяли в 15 мл диметилформамида (ДМФА), раствор охлаждали до 0°С, прибавляли 1,4 мл (10 ммоль) триэтиламина (ТЭА) и 4,1 г (10,5 ммоль) пентафторфенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонилтреонина. Смесь выдерживали 30 мин при 25°С, разбавляли 300 мл этилацетата, последовательно промывали 0,1 н. соляной кислотой (2×100 мл), водой (2×100 мл), 5% водным раствором соды (3×100 мл) и снова водой (2×100 мл). Органический слой отделяли, сушили сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Получили 4,7 г (98%) метилового эфира *трет*-бутилоксикарбонилтреонил-фенилаланил-треонина (IIIб) в виде бесцветной пенистой массы. Вещество использовали для дальнейшего синтеза без дополнительной очистки. Полученное соединение (IIIб) растворяли в 30 мл метанола, к полученному раствору прибавляли 8 мл 2 н. водного раствора гидроксида натрия, смесь выдерживали 1 ч при 20°С, затем прибавляли к раствору 4 г дауэкса 50 W в H<sup>+</sup>-форме, смесь перемешивали 10 мин, фильтровали и фильтрат упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 150 мл этилацетата, полученный раствор нагревали до кипения и смешивали с 80 мл петролейного эфира. После охлаждения смеси растворитель удаляли декаптацияей, а остаток высушивали в вакууме. Получили 4 г (86%) трипептида (IV) в виде бесцветной пенистой массы с т. пл. 96—99°С,  $R_f$  0,60 (Б), 0,20 (Г), 0,20 (Д),  $[\alpha]_D^{23} -19,7^\circ$  (*c* 2,0; CH<sub>3</sub>OH). Найдено, %: С 56,58; Н 7,20; N 8,87. C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>. Вычислено, %: С 56,52; Н 7,11; N 8,99.

*Вос-Lys(Z)-Thr-Phe-Thr-OH* (V). Растворили 4,7 г (10 ммоль) соединения (IV) в 10 мл (130 ммоль) трифторуксусной кислоты, раствор выдерживали 40 мин при 20°С, прибавляли 200 мл эфира, образовавшийся оса-

док отфильтровывали и высушивали в вакууме. Полученное вещество растворяли в 15 мл ДМФА, прибавлением 2,9 мл (21 ммоль) ТЭА доводили раствор до pH 8, прибавляли 5,8 г (10,5 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*<sup>α</sup>-*tert*-бутилоксикарбонил-*N*<sup>ε</sup>-бензилоксикарбониллизина и смесь выдерживали 30 мин при 25° С. Затем прибавляли 300 мл этилацетата и полученную смесь последовательно промывали 0,1 н. соляной кислотой (2×100 мл) и водой (2×100 мл). Органический слой отделяли, сушили сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали из смеси изопропанол — петролейный эфир (1 : 2). Получили 6,7 г (92%) тетрапептида (V) с т. пл. 123—125° С, *R*<sub>f</sub> 0,60 (Б), 0,25 (Г), 0,30 (Д),  $[\alpha]_D^{25}$  -26,3° (*c* 2,0; CH<sub>3</sub>OH). Найдено, %: С 59,25; Н 7,21; N 9,76. C<sub>36</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>. Вычислено, %: С 59,25; Н 7,04; N 9,60.

*Boc-Trp-Lys(Z)-Thr-Phe-Thr-OH* (VI). Растворяли 7,3 г (10 ммоль) соединения (V) в 15 мл (200 ммоль) трифторуксусной кислоты, раствор выдерживали 1 ч при 5° С, прибавляли 250 мл эфира, смесь охлаждали до 0° С, образовавшийся осадок отделяли фильтрованием и высушивали в вакууме. Полученное вещество растворяли в 20 мл ДМФА, прибавлением 3 мл (22 ммоль) ТЭА доводили раствор до pH 8. Затем прибавляли 4,9 г (10,5 ммоль) пентафторфенилового эфира *tert*-бутилоксикарбонилтриптофана и смесь выдерживали 30 мин при 25° С. К полученному раствору прибавляли 200 мл 0,1 н. уксусной кислоты, смесь охлаждали до 5° С, выделившееся в осадок вещество отфильтровывали, высушивали в вакууме и перекристаллизовывали из смеси изопропанол — петролейный эфир (1 : 1). Получили 8,5 г (93%) пентапептида (VI) с т. пл. 181—182° С (разл.), *R*<sub>f</sub> 0,45 (Б), 0,30 (Д), 0,40 (И),  $[\alpha]_D^{25}$  -27,3° (*c* 2,0; CH<sub>3</sub>OH). Найдено, %: С 61,48; Н 6,76; N 10,83. C<sub>47</sub>H<sub>61</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>. Вычислено, %: С 61,62; Н 6,71; N 10,70.

*Nps-Trp-OPfp* (VIa). К раствору 3,6 г (10 ммоль) *o*-нитрофенилсульфенилтриптофана и 2,2 г (12 ммоль) пентафторфенола в 20 мл этилацетата прибавляли при 0° С 2,2 г (11 ммоль) *N,N'*-дициклогексилкарбодимида (ДЦГК). Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 0° С и 40 мин при 20° С, далее охлаждали до 0° С и осадок *N,N'*-дициклогексилмочевины (ДЦГМ) отфильтровывали. Фильтрат упаривали в вакууме, остаток кристаллизовали из смеси этилацетат — гексан (1 : 2). Получали 4,3 г (82%) соединения (VIa) с т. пл. 146—147° С, *R*<sub>f</sub> 0,90 (Г), 0,90 (И), 0,50 (Р);  $[\alpha]_D^{25}$  -97,3° (*c* 1,0; CH<sub>3</sub>OH). Найдено, %: С 52,78; Н 2,67; N 8,09. C<sub>23</sub>H<sub>11</sub>F<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Вычислено, %: С 52,77; Н 2,70; N 8,03.

*Nps-Trp-Lys(Z)-Thr-Phe-Thr-OH* (VIb). Синтез проводили аналогично предыдущему, исходя из 7,3 г (10 ммоль) соединения (V) и 5,5 г (10,5 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*<sup>α</sup>-(*o*-нитрофенилсульфенил)-триптофана. Получили 8,6 г (89%) пентапептида (VIb) с т. пл. 189—191° С, *R*<sub>f</sub> 0,35 (Б), 0,20 (Д), 0,20 (И),  $[\alpha]_D^{25}$  -19,0° (*c* 1,0; ДМФА). Найдено, %: С 59,64; Н 5,95; N 11,48. C<sub>48</sub>H<sub>53</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S. Вычислено, %: С 59,55; Н 5,73; N 11,58.

*Boc-Trp-Lys(Z)-Thr-Phe-Thr-OPfp* (VII). К раствору 4,6 г (5 ммоль) соединения (VI) и 1,8 г (10 ммоль) пентафторфенола в 15 мл ДМФА прибавляли при 0° С 1 г (5 ммоль) ДЦГК, смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 30 мин при 20° С. Выделившуюся в осадок ДЦГМ отфильтровывали, к фильтрату прибавляли 200 мл эфира, охлаждали до 0° С, выпавшее в осадок вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме. Получили 5,4 г (100%) соединения (VII), которое использовали для дальнейшего синтеза без дополнительной очистки.

*Nps-Trp-Lys(Z)-Thr-Phe-Thr-OPfp* (VIIa). Синтез проводили аналогично описанному в опыте 7, исходя из 4,8 г (5 ммоль) соединения (VIa). Получили 5,7 г (100%) соединения (VIIa), которое использовали для дальнейшего синтеза без дополнительной очистки.

*Boc-Ser-Cys(Thp)-OH* (VIII). К раствору 4,1 г (20 ммоль) *S*-тетрагидропиранилцистеина [15] в 10 мл 2 н. гидроксида натрия прибавляли при

5° С раствор 7,4 г (20 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*-трет-бутилоксикарбонилсерина в 20 мл ДМФА. Смесь перемешивали 15 мин при 5° С, прибавляли к ней еще 1,9 г (5 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*-трет-бутилоксикарбонилсерина и 5 мл 2 н. гидроксида натрия, реакцию смесь перемешивали еще 15 мин при 20° С, прибавляли 100 мл метанола и к полученному раствору прибавляли 5 г дауэкса 50 W в H<sup>+</sup>-форме. Смесь энергично перемешивали 5 мин, катионообменную смолу отделяли фильтрованием и фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 100 мл ацетона, к полученному раствору прибавляли 5,9 мл (30 ммоль) дициклогексиламина и смесь выдерживали 48 ч при 0° С. Выпавшее в осадок вещество отфильтровывали и перекристаллизовывали из 50 мл этанола. Получили 8,4 г (73%) дипептида (VIII) в виде дициклогексиламмониевой соли с т. пл. 167–168° С, *R*<sub>f</sub> 0,65 (B), 0,50 (E), 0,60 (Ж);  $[\alpha]_D^{24} +55,5^\circ$  (*c* 2,0; CH<sub>3</sub>OH). Найдено, %: С 58,72; Н 9,08; N 6,91. C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S · C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>N. Вычислено, %: С 58,61; Н 8,96; N 7,32.

*Nps-Ser-OPfp* (VIIIe). К раствору 2,6 г (10 ммоль) *N*-(*o*-нитрофенилсульфенил)серина и 2,2 г (12 ммоль) пентафторфенола в смеси из 5 мл ДМФА и 15 мл этилацетата прибавляли при 0° С 2,2 г (11 ммоль) ДЦГК. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 0° С и 40 мин при 20° С, далее охлаждали до 0° С и осадок ДЦГМ отфильтровывали. Фильтрат упаривали в вакууме досуха; остаток кристаллизовали из смеси этилацетат — гексан (1:1). Получали 2,8 г (67%) соединения (VIIIв) с т. пл. 129–130° С. *R*<sub>f</sub> 0,85 (Г), 0,60 (II), 0,40 (P);  $[\alpha]_D^{25} -138,1^\circ$  (*c* 1,0; CH<sub>3</sub>OH). Найдено, %: С 42,42; Н 2,18; N 6,65. C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>F<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S. Вычислено, %: С 42,46; Н 2,14; N 6,60.

*Nps-Ser-Cys(Thp)-OH* (VIIIa). Синтез проводили аналогично предыдущему, исходя из 4,1 г (20 ммоль) S-тетрагидропиранилцистеина и 10,6 г (25 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*-(*o*-нитрофенилсульфенил)серина. После двукратной перекристаллизации из этилацетата получили 7,8 г (62%) соединения (VIIIa) в виде дициклогексиламмониевой соли с т. пл. 116–118° С, *R*<sub>f</sub> 0,80 (B), 0,75 (E), 0,55 (Ж);  $[\alpha]_D^{24} +16,4^\circ$  (*c* 2,0; CH<sub>3</sub>OH). Найдено, %: С 55,54; Н 7,35; N 8,97. C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> · C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>N. Вычислено, %: С 55,56; Н 7,40; N 8,94.

*Boc-Trp-Lys(Z)-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys(Thp)-OH* (IX). а) К раствору 1,7 г (3 ммоль) дициклогексиламмониевой соли дипептида (VIII) в 10 мл метанола прибавляли 2 г дауэкса 50 W в H<sup>+</sup>-форме, смесь встряхивали 5 мин, катионообменную смолу отфильтровывали и фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 10 мл хлороформа, прибавляли 2,3 мл (30 ммоль) трифторуксусной кислоты и смесь выдерживали 3 ч при 10° С. Затем смесь упаривали в вакууме, остаток растирали с 20 мл ацетона, полученную смесь фильтровали и к фильтрату прибавляли 100 мл эфира. Смесь охлаждали до 0° С, растворитель отделяли декантацией, остаток высушивали в вакууме. Получили 0,9 г (77%) трифторацетата серил-S-тетрагидропиранилцистеина в виде гигроскопичной пенистой массы. Полученное вещество растворяли в 2,5 мл ДМФА, прибавлением 0,66 мл (4,8 ммоль) ТЭА доводили раствор до pH 8, прибавляли раствор 2,1 г (2 ммоль) соединения (VII) в 4 мл ДМФА и смесь выдерживали 40 мин при 25° С. Затем прибавляли 80 мл 0,2 н. уксусной кислоты, смесь охлаждали до 0° С, выпавшее в осадок вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме. После двукратной перекристаллизации из смеси этанол — петролейный эфир (3:1) получили 1,9 г (82%) гептапептида (IX) с т.пл. 178–180° С, *R*<sub>f</sub> 0,45 (B), 0,60 (Ж),  $[\alpha]_D^{23} -10,8^\circ$  (*c* 1,0; ДМФА). Найдено, %: С 58,29; Н 6,76; N 11,00. C<sub>58</sub>H<sub>79</sub>N<sub>9</sub>O<sub>16</sub>S. Вычислено, %: С 58,52; Н 6,69; N 10,59. Аминокислотный анализ: Lys 0,97; Thr 1,94; Phe 1,00; Ser 0,96; Cys 1,11.

б) К раствору 1,9 г (3 ммоль) дициклогексиламмониевой соли дипептида (VIIIa) в 10 мл метанола прибавляли 2 г дауэкса 50 W в H<sup>+</sup>-форме, смесь перемешивали встряхиванием 5 мин при 5° С, катионо-

обменную смолу удаляли фильтрованием, фильтрат упаривали в вакууме, к остатку прибавляли 60 мл этилацетата, полученный раствор охлаждали до 0° С и прибавляли 1,5 мл 4 н. раствора хлористого водорода в диоксане. Выделившееся в осадок вещество отфильтровывали и промывали эфиром. Получили 0,9 г (91%) хлоргидрата серил-S-тетрагидропиранилцистеина в форме бесцветных мелких кристаллов. Полученное вещество растворяли в 3 мл ДМФА, прибавляли к раствору 0,8 мл (5,4 ммоль) ТЭА и раствор 2,6 г (2,5 ммоль) соединения (VII) в 5 мл ДМФА. Полученную смесь выдерживали 40 мин при 25° С, затем прибавляли 60 мл 0,2 н. уксусной кислоты, охлаждали до 0° С, выпавшее в осадок вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме. После перекристаллизации из смеси этанол — петролейный эфир (3 : 1) получили 2,5 г (88%) гептапептида (IX), идентичного по всем константам образцу, полученному в предыдущем опыте.

*Nps-Trp-Lys(Z)-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys(Thp)-OH (IXa)*. Синтез проводили по методике, аналогичной предыдущей (пункт б), исходя из 1,9 г (3 ммоль) дициклогексиламмониевой соли дипептида (VIIIa) и 2,7 г (2,4 ммоль) пентапептида (VIIa). Получили 2,7 г (90%) гептапептида (IXa) с т.пл. 139—142° С,  $R_f$  0,35 (В), 0,45 (Ж),  $[\alpha]_D^{23} -12,0^\circ$  (с 1,0; ДМФА). Найдено, %: С 57,27; Н 6,14; N 11,39.  $C_{59}H_{74}N_{10}O_{16}S_2$ . Вычислено, %: С 56,99; Н 6,00; N 11,27. Аминокислотный анализ: Lys 0,97; Thr 1,88; Phe 1,00; Ser 1,20; Cys 0,43.

*H-Trp-Lys(Z)-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys(Thp)-OH (X)*. а) К раствору 1,2 г (1 ммоль) гептапептида (IX) в 3 мл ДМФА прибавляли 0,4 мл анизола и 0,1 мл тиогликолевой кислоты, смесь охлаждали до 5° С и прибавляли 6,1 мл (80 ммоль) трифторуксусной кислоты. Раствор выдерживали 3 ч при 5° С, затем упаривали в вакууме, остаток растворяли в 5 мл диметилсульфоксида, прибавляли 0,25 мл (1 ммоль) 4 н. раствора хлористого водорода в диоксане и 200 мл эфира. Выпавшее в осадок вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме над твердым едким кали. Получили 1,1 г (100%) соединения (X) в форме монохлоргидрата. Аминокислотный анализ: Lys 1,02; Thr 2,00; Phe 0,99; Ser 0,88; Cys 1,04. Полученное вещество использовали в дальнейшем синтезе без дополнительной очистки.

б) К раствору 1,2 г (1 ммоль) гептапептида (IXa) в смеси 5 мл ДМФА и 1,5 мл анизола прибавляли при 0° С 0,75 мл (3 ммоль) 4 н. раствора хлористого водорода в диоксане, смесь выдерживали 5 мин при 0° С и прибавляли 300 мл эфира. Выпавшее в осадок вещество отделяли фильтрованием и высушивали в вакууме. Получили 1,1 г (100%) соединения (X) в виде монохлоргидрата. Аминокислотный анализ: Lys 0,94; Thr 2,00; Phe 0,93; Ser 1,26; Cys 1,03. Полученное вещество использовали в дальнейшем синтезе без дополнительной очистки.

*Boc-Ala-Gly-Cys(Thp)-Lys(Z)-Asn - Phe - Phe-Trp-Lys(Z)-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys(Thp)-OH (XI)*. К раствору 1,2 г (1,1 ммоль) гептапептидгидразида (II) [7] в смеси 4 мл ДМФА и 4 мл диметилсульфоксида, охлажденному до -20° С, прибавляли 1 мл (4 ммоль) 4 н. раствора хлористого водорода в диоксане, а затем 0,16 мл (1,5 ммоль) бутилнитрита. Раствор перемешивали 20 мин при -20° С, прибавляли раствор 1,1 г (1 ммоль) хлоргидрата гептапептида (X) в 6 мл диметилсульфоксида и затем 0,84 мл (6 ммоль) ТЭА. Смесь перемешивали 5 ч при 0° С, 10 ч при 10° С и 20 ч при 20° С. Затем прибавляли 1 мл ледяной уксусной кислоты и 250 мл эфира, выпавшее в осадок вещество отделяли фильтрованием, последовательно промывали эфиром, хлористым метилом, хлороформом и ацетоном. Полученное вещество обрабатывали далее 250 мл кипящего этанола, смесь охлаждали и осадок отфильтровывали. Получили 1,74 г (80%) соединения (XI) с т.пл. 224—226° С (разл.),  $[\alpha]_D^{23} -16,3^\circ$  (с 1,0; диметилсульфоксид). Найдено, %: С 59,03; Н 6,64; N 11,72.  $C_{107}H_{142}N_{18}O_{27}S_2$ . Вычислено, %: С 59,04; Н 6,58; N 11,58. Аминокислотный анализ: Ala 1,00; Gly 1,06; Cys 1,91; Lys 2,04; Asp 1,23; Phe 3,02; Thr 1,91; Ser 0,96.

*Соматостатин (I)*. Растворяли 220 мг (0,1 ммоль) соединения (XI) в



10 мл трифторуксусной кислоты, прибавляли 0,5 мл анизола и 0,3 мл  $\beta$ -меркаптоэтанола, затем через полученный раствор пропускали сухой бромистый водород 30 мин при 20° С. Далее раствор упаривали в вакууме, остаток растворяли в смеси 3 мл ДМФА и 5 мл метанола и к раствору прибавляли 150 мл эфира. Выпавшее в осадок вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме. Получили 190 мг (100%) трибромгидрата тетрадекапептида (XII). Полученное вещество растворяли в 4 мл 2 н. уксусной кислоты и раствор наносили на колонку (2,3×110 см) с сефадексом G-25 (fine). Через колонку пропускали 2 н. уксусную кислоту, содержащую  $\beta$ -меркаптоэтанол (0,01 экв/л), отбирая на автоматическом коллекторе фракции по 6 мл (скорость элюции 1,7 мл/мин). Собранные фракции фотометрировали при 278 нм, фракции 31—63 объединяли и лиофилизировали. Полученное вещество растворяли в 2 л 0,01 М водного раствора ацетата аммония, прибавлением 0,5 н. водного аммиака доводили реакцию раствора до pH 6,9 и полученный раствор выдерживали 72 ч при 8° С. Затем раствор концентрировали в вакууме до объема 150 мл и полученный концентрированный раствор подвергали лиофилизации. Полученное вещество растворяли в 2 мл верхней фазы системы *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Этот раствор наносили на колонку (2×100 см) с сефадексом G-25 (fine), предварительно уравновешенную сначала нижней, а затем верхней фазой указанной системы растворителей. Через колонку пропускали верхнюю фазу этой же системы, собирая с помощью автоматического коллектора фракции по 5 мл (скорость элюции 0,3 мл/мин). После фотометрирования при 278 нм фракции 49—64, содержавшие вещество с  $R_f$  0,36, объединяли и лиофилизировали\*. Получили 35 мг (22%) соматостатина (I) с  $R_f$  0,17 (K), 0,10 (Л), 0,30 (M);  $[\alpha]_D^{23}$   $-34,5^\circ$  ( $c$  0,25; 1%  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ). Аминокислотный анализ: Ala 1,00; Gly 1,20; Cys 2,22; Lys 1,96; Asp 1,24; Phe 3,06; Thr 1,91; Ser 0,91.

Литературные данные:  $R_f$  0,20 (K) [2], 0,11 (Л) [11], 0,38 (M) [6];  $[\alpha]_D^{22}$   $-32,3^\circ$  ( $c$  0,244; 1%  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) [11],  $-34,8^\circ$  ( $c$  0,5; 1%  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) [2].

Оценка биологической активности синтетического соматостатина (I) в опытах *in vitro* и *in vivo* [7] показала, что по специфической гормональной активности синтетический соматостатин (I) не отличается от природного гормона, а также от препаратов синтетического соматостатина, полученных в нашей лаборатории ранее [7].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R. (1973) *Science*, **179**, 77—79.
2. Sarantakis D., McKinley W. A. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **54**, 234—238.
3. Immer H. U., Sestanjk K., Nelson V. R., Götz M. (1974) *Helv. chim. acta*, **57**, 730—734.
4. Пат. США 3, 862, 925 (1975); РЖХим, 3025 (1976).
5. Пат. США 3, 917, 578 (1975); РЖХим, 13 418 (1976).
6. Пат. ФРГ 2, 458, 135 (1975).
7. Швачкин Ю. П., Смирнова А. П., Шишкина А. А., Ермак Н. М., Федотов В. П., Комолов И. С., Морозова Л. Г., Плужникова Г. Н., Садовникова Н. В. (1979) *Биоорганическая химия*, **5**, 169—180.
8. Rivier J., Brazeau P., Vale W., Ling N., Burgus R., Gilon C., Yardley J., Guillemin R. (1973) *Compt. Rend.*, **D276**, 2737—2740.
9. Yamashiro D., Li C. H. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **54**, 882—888.
10. Coy D. H., Coy E. J., Arimura A., Schally A. V. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1267—1273.
11. Rivier J. E. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 2986—2992.
12. Гирия С. К., Швачкин Ю. П. (1978) *Ж. общ. химии*, **48**, 902—908.
13. Гирия С. К., Швачкин Ю. П. (1978) *Ж. общ. химии*, **48**, 1887—1891.

\* При колоночной хроматографии величину  $R_f$  вычисляли из отношения  $V_0/V_e$ , где  $V_0$  — удерживаемый объем колонки, а  $V_e$  — объем элюции компонента [16].

14. Гирин С. К., Швачкин Ю. П. (1979) *Ж. общ. химии*, 49, 451-457.
15. Zahn H., Hammerström K. (1969) *Chem. Ber.*, 102, 1048-1052.
16. Yamashiro D. (1964) *Nature*, 201, 76-77.

Поступила в редакцию  
30.VII.1979

## NATURAL PEPTIDES AND THEIR ANALOGS. XXIII. SOMATOSTATIN SYNTHESIS WITHOUT HYDROXYL PROTECTION IN HYDROXY AMINO ACID RESIDUES

SHVACHKIN Yu. P., GIRIN S. K., SMIRNOVA A. P., SHISHKINA A. A.,  
ERMAK N. M.

*Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

A total chemical synthesis of somatostatin has been performed according to the new scheme which permits the use of hydroxy amino acid (Thr<sup>10</sup>, Thr<sup>12</sup>, Ser<sup>13</sup>) derivatives without protecting their hydroxyls. The synthetic somatostatin is analytically pure and its physico-chemical and biological properties are identical with those of the natural hormone.

---