

# Синтез Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-L-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ile, Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-L-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub> и Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-D-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub> – меченых аналогов человеческого β-казоморфина и дерморфина

© В. П. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Л. Ю. Алфеева, Л. А. Андреева, К. В. Шевченко, Н. Ф. Мясоедов

*Институт молекулярной генетики РАН, Москва*

Получено 27.01.2003

УДК 546.100.02.3:547.15/17

Проведен синтез ненасыщенных по пролину аналогов человеческого β-казоморфина и дерморфина. Отработаны условия введения тритиевой метки в эти пептиды. Показано, что более перспективным методом является введение метки до снятия защитных групп, так как в этом случае реакцию можно проводить в апротонных растворителях. В последнем случае молярная радиоактивность препаратов возрастала в 5–6 раз.

Уже многие годы в центре внимания исследователей находятся нейропептиды, в особенности нейромедиаторы [1]. Влияние нейропептидов на центральную нервную систему очень многообразно. Многие пептиды являются потенциальными лекарственными веществами [2]. Одной из важных регуляторных систем организма является эндогенная опиоидная система. Имеются данные об участии эндогенной опиоидной системы в ответе организма на стрессовое воздействие. Эта система обладает адаптивной активностью, играет важную роль в регуляции эмоциональной сферы, процессов обучения, памяти, деятельности дыхательной, сердечно-сосудистой, пищевой и иммунной систем [3].

Одним из наиболее мощных известных в настоящее время природных анальгетиков и единственным природным пептидом, оказывающим огромное влияние на систему терморегуляции при периферическом способе введения, является гептапептид дерморфин (H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>). Проведенные исследования показали широкий спектр физиологической активности дерморфина [4].

Однако полисистемное действие таких пептидов является в ряде случаев нежелательным фактором, например, при использовании этого соединения в качестве лекарственного средства. Поэтому необходимо установить влияние различных фрагментов молекулы дерморфина на его физиологическую активность. Это позволит выявить ключевые фрагменты пептидной цепи, необходимые для проявления ожидаемых биологических эффектов, что является ключом к направленному синтезу подобного рода пептидов с заданной биологической активностью.

Другим классом опиоидов являются пептиды – фрагменты белков пищевого происхождения. Они соответственно поступают в организм извне, за что и названы экзорфинами. К этой группе относятся пептиды, выделенные из гидролизата пшеничного глютена – экзорфины А, В и С – и гидро-

лизатов казеинов молока – казоморфины [5].

Наиболее активно изучаемая группа экзорфинов – фрагменты казеинов молока. Казеины, как известно, являются одной из важнейших групп белков, входящих в питание человека, что и обуславливает значительный интерес к анализу особенностей их структуры и метаболизма. По своей природе они являются фосфопротеинами и составляют 80% белков молока коровы и около 30% белков женского молока [6]. Исследование фракций гидролизатов казеина, имеющих опиоидную активность, показало, что активным началом в них являются β-казоморфины. β-Казоморфин человека имеет аминокислотную последовательность Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile [7]. Высокая устойчивость β-казоморфинов к действию пептидаз обусловлена наличием в их молекулах большого количества пролиновых остатков. Поэтому β-казоморфины относительно медленно распадаются во внутренней среде организма и часто используются как стандартные субстраты при анализе свойств различных пептидаз (прежде всего пролил-дипептидилпептидаз) [8].

Регуляторные пептидные системы осуществляют тонкую настройку (модуляцию) различных функциональных ансамблей на клеточном и системном уровнях; их роль особенно возрастает в критические периоды роста и развития организма. Так, существуют серьезные основания, свидетельствующие о том, что β-казоморфины, вероятно, могут оказывать положительное влияние на становление и развитие ЦНС и играть определенную роль в процессах индивидуального развития [9].

В этой связи особый интерес представляет синтез модифицированных пептидов, что позволяет изучать зависимость биологической активности этих соединений от их аминокислотной последовательности и конформации в растворе, моделировать механизмы их биологического действия и получать аналоги, более активные, чем природные пептиды.

Химический синтез пептидов обычно проводят или традиционным синтезом в растворе, или твердофазным методом [10]. Последний является более эффективным и позволяет получать на автоматических синтезаторах пептиды, содержащие до 200 аминокислот. Метод синтеза в растворе более удобен для синтеза пептидов до 10 остатков аминокислот, так как позволяет получать их в больших количествах и с большей степенью чистоты. Несомненным преимуществом химического метода синтеза является возможность включать в состав пептидов и белков *D*-аминокислоты и вообще любые неприродные аминокислоты.

Основные методы традиционного классического синтеза в растворе – ступенчатый и блочный [11]. Правильный выбор защитных групп и их подходящих комбинаций остается одной из главных проблем в химическом синтезе пептидов. Одной из самых удобных защитных групп является *трет*-бутилоксикарбонильная (Boc) группа. Она легко вводится в аминокислоту и легко удаляется. Постепенное наращивание молекулы пептида с *C*-конца предохраняет аминокислоту от рацемизации, что очень важно при синтезе пептидов [12]. Boc-группа устойчива к каталитическому гидрированию, восстановлению натрием в жидком аммиаке и к щелочному гидролизу [13]. Аминокислоты, защищенные по аминогруппе Boc-группой, можно активировать всеми обычными методами [14]. Boc-группа легко снимается HCl в уксусной кислоте, диоксане, этилацетате, метаноле, а также трифторуксусной кислотой в хлористом метиле. Защита карбоксильной группы может быть осуществлена этерификацией последней с образованием соответствующих метиловых, этиловых, бензиловых и *трет*-бутиловых эфиров [11]. При современном синтезе пептидов наиболее широко применяются следующие методы образования пептидной связи: карбодимидный; азидный; метод смешанных ангидридов; метод активированных эфиров; карбоксиангидридный [15].

Целью настоящей работы является синтез аналогов  $\beta$ -казоморфинов и дерморфинов, содержащих ненасыщенный пролин, и получение соответствующих меченных тритием препаратов.

### Экспериментальная часть

Аминокислоты, катализаторы, реагенты и растворители – коммерческие препараты. Температуры плавления, определенные на столике для плавления Boetius, даны без исправления. Элементный анализ пептидов проводили на анализаторе Carlo Erba модель 1106 (полученные значения удовлетворительно совпадали с теоретическими). Оптическое вращение измеряли на цифровом поляриметре марки А1-ЕПО.

Идентификацию и гомогенность полученных соединений проверяли с помощью тонкослойной хро-

матографии (ТСХ) на пластинках Silufol (Чехия) и высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Вещества при использовании ТСХ обнаруживали, опрыскивая пластинки раствором нингидрина.

### Синтез HCl·Tyr–3,4-дегидро-DL-Pro–Ser–OMe

**1. Получение ди-Boc–Tyr.** К суспензии 50 г (276 ммоль) *L*-Tyr в 690 мл воды прибавляли раствор 185 мл (746.2 ммоль) *ди-трет*-бутилпирикарбоната (Boc<sub>2</sub>O) в 310 мл изопропанола. При энергичном перемешивании на механической мешалке по каплям из капельной воронки прибавляли раствор 8 моль/л KOH (350 мл) до pH 12. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, поддерживая pH в интервале 11.5–12, ход реакции контролировали методом ТСХ в системе ацетон–бензол–уксусная кислота (50 : 100 : 1),  $R_f$  0.49. После окончания реакции реакционную смесь разбавляли водой до 2 л, подкисляли пятикратным избытком NaHSO<sub>4</sub> до pH 3. При подкислении происходило бурное выделение газа. Продукты реакции экстрагировали этилацетатом (10 × 150 мл). Объединенные органические экстракты промывали 150 мл воды и 150 мл насыщенного раствора NaCl, сушили в течение 30 мин над MgSO<sub>4</sub>, отфильтровывали и упаривали. Остаток растирали в петролейном эфире до образования кристаллического осадка. Кристаллическую массу отфильтровывали, промывали гексаном и высушивали в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, KOH и парафином. Выход 96.9% (102 г, 267.7 ммоль), т.пл. 94–97°C,  $[\alpha]_D^{20} = +29.5$  ( $c = 1$  моль/л; диоксан).

**2. Получение ди-Boc–TyrOSu.** 4.7 г (12.32 ммоль) ди-Boc–Tyr растворяли в 100 мл ацетонитрила, охлаждали до 0°C и добавляли 1.84 г (16.02 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид (SuOH), охлаждали до 0°C и добавляли 3.62 г (16.02 ммоль) *N,N*-дициклогексикарбодимид (ДЦГК). Перемешивали на магнитной мешалке 1 ч, охлаждали до 0°C. Реакционную смесь отфильтровывали, упаривали, добавляли 100 мл этилацетата, промывали водой, 10%-ным раствором KHSO<sub>4</sub>, водой, 5%-ным раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, насыщенным раствором NaCl. Раствор этилацетата сушили над MgSO<sub>4</sub>, отфильтровывали, упаривали. Выход 87% (полученный реагент использовали без дальнейшей очистки).

**3. Ди-Boc–Tyr–3,4-дегидро-DL-Pro.** К 315 мг (2.79 ммоль) 3,4-дегидро-DL-Pro добавляли 5.95 мл (2.79 ммоль) 13%-ного раствора гидроксида тетрабутиламмония (ТБА), упаривали с 10 мл этанола, с 10 мл изопропанола и с 10 мл бензола, охлаждали до 0°C. К охлажденному раствору ТБА 3,4-дегидро-DL-Pro в 10 мл абсолютного этилацетата при охлаждении добавляли в сухом виде 1.34 г (2.79 ммоль) ди-Boc–Tyr–OSu, перемешивали 1 ч при комнатной температуре на маг-

нитной мешалке. За ходом реакции следили по ТСХ в системе ацетон-бензол-уксусная кислота (2 : 1 : 1),  $R_f$  0.38.

По окончании реакции растворитель упаривали, добавляли воду, подкисляли пятикратным избытком  $\text{NaHSO}_4$  до pH 3, экстрагировали этилацетатом (5 × 50 мл). Объединенные этилацетатные фракции промывали водой, 10%-ным раствором  $\text{KHSO}_4$ , водой, сушили над  $\text{MgSO}_4$ , упаривали, высаживали из эфира гексаном (дважды). Осадок в виде порошка сушили в вакууме. Выход 99% (1.32 г, 2.76 ммоль).

**4. Ди-Вос-Тур-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-ОМе.** Ди-Вос-Тур-3,4-дегидро-DL-Pro (1.32 г, 2.76 ммоль) растворяли в 20 мл ацетонитрила, добавляли 413 мг (3.59 ммоль)  $\text{SuOH}$ , охлаждали до 0°C и добавляли 811 мг (3.59 ммоль) ДЦГК. Перемешивали на магнитной мешалке 1 ч, охлаждали до 0°C, добавляли 558 мг (3.59 ммоль)  $\text{HCl} \cdot \text{Ser-OМе}$  и 0.5 мл (3.59 ммоль) триэтиламина, перемешивали 1 ч при охлаждении и 2 сут при комнатной температуре. Реакционную смесь отфильтровывали, упаривали, добавляли 100 мл этилацетата, промывали водой, 10%-ным раствором  $\text{KHSO}_4$ , водой, 5%-ным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, насыщенным раствором  $\text{NaCl}$ . Раствор этилацетата сушили над  $\text{MgSO}_4$ , отфильтровывали, упаривали. Переосаждали дважды из ацетона гексаном. Остаток анализировали ТСХ в системах ацетон-бензол-уксусная кислота (2 : 1 : 1),  $R_f$  0.24, и хлороформ-метанол-аммиак (8 : 1.75 : 0.25),  $R_f$  0.81. Полученный осадок сушили в вакууме. Выход 86% (1.38 г, 2.38 ммоль).

**5. Получение  $\text{HCl} \cdot \text{Tyr-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-OМе}$ .** К 1.38 г (2.38 ммоль) ди-Вос-Тур-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-ОМе добавляли 7.14 мл 1 моль/л  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$  и 2% (0.14 мл) анизол. Выдерживали 45 мин при комнатной температуре, упаривали, высаживали из метанола эфиром. Остаток анализировали ТСХ в системе хлороформ-метанол-аммиак (8 : 1.75 : 0.25),  $R_f$  0.51. Выход 81% (0.86 г, 1.93 ммоль).

#### Синтез ди-Вос-Тур-D-Ala-Phe-Gly

**1. Получение ди-Вос-Тур-D-Ala.** 5 г (13.1 ммоль) ди-Вос-Тур растворяли в 40 мл ацетонитрила, прибавляли 2.0 мл (14.4 ммоль) триэтиламина. Охлаждали до -10°C, прибавляли 1.8 мл (14.4 ммоль) хлорангидрида триметилуксусной кислоты и выдерживали 20 мин при -10°C. Затем к реакционной смеси прибавляли охлажденный до -20°C раствор 1.52 г (17.0 ммоль) D-Ala в 13 мл воды, 8.8 мл ацетонитрила и 2.4 мл (17.0 ммоль) триэтиламина. Реакцию вели при постепенном нагревании до +10°C и затем еще 1 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Реакционную смесь отфильтровывали, упаривали, добавляли 10 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ,

подкисляли трехкратным избытком  $\text{KHSO}_4$  до pH 3. Водный раствор экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл). Объединенные фракции этилацетата промывали 10%-ным раствором  $\text{KHSO}_4$ , водой, насыщенным раствором  $\text{NaCl}$ , сушили над  $\text{MgSO}_4$ , упаривали, высаживали из этилацетата гексаном, сушили в вакууме. Остаток анализировали ТСХ в системах ацетон-бензол-уксусная кислота (2 : 1 : 1),  $R_f$  0.36, хлороформ-метанол-аммиак (8 : 1.75 : 0.25),  $R_f$  0.57 и хлороформ-метанол (9 : 1),  $R_f$  0.51. Выход 80.9% (4.8 г, 10.6 ммоль).

**2. Получение Вос-Phe-Gly.** 5.3 г (20 ммоль) Вос-Phe растворяли в 70 мл ацетонитрила, добавляли 3.1 мл (22 ммоль) триэтиламина. Охлаждали до -20°C и прибавляли 2.7 мл (22 ммоль) хлорангидрида триметилуксусной кислоты. Смесь выдерживали при -10°C 20 мин и затем прибавляли охлажденный до -20°C раствор 1.8 г (24 ммоль) Gly в 20 мл воды, 20 мл ацетонитрила и 3.4 мл (24 ммоль) триэтиламина. Реакцию вели 1 ч при -20°C и 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, добавляли 10 мл воды, подкисляли пятикратным избытком  $\text{NaHSO}_4$  до pH 3, экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл). Фракции этилацетата объединяли, промывали водой, 10%-ным раствором  $\text{KHSO}_4$ , водой, насыщенным раствором  $\text{NaCl}$ , сушили над  $\text{MgSO}_4$ . Отфильтрованный раствор упаривали, диспергировали в эфире, отфильтровывали и сушили в вакууме. Остаток анализировали ТСХ в системах бензол-этанол (8 : 2),  $R_f$  0.42, ацетон-бензол-уксусная кислота (2 : 1 : 1),  $R_f$  0.21 и гексан-ацетон (3 : 2),  $R_f$  0.39. Выход 66% (4.27 г, 13.25 ммоль).

**3. Получение Phe-Gly.** К 2 г (6.2 ммоль) Вос-Phe-Gly добавляли 9.3 мл раствора 1 моль/л  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$ , выдерживали 45 мин при комнатной температуре, заливали эфиром, растирали (эфир меняли 3 раза) и сушили в вакууме. Затем к 4.42 г осадка прибавляли 58.5 мл (34.4 ммоль) функциональных групп смолы Amberlyst (AcO-форма) в 40%-ном этаноле, перемешивали 20 мин на магнитной мешалке, переносили на стеклянный фильтр, отмывали 40%-ным этанолом, упаривали. Полученный осадок промывали на фильтре эфиром и сушили в вакууме. Остаток анализировали ТСХ в системах бензол-этанол (8 : 2),  $R_f$  0.70, хлороформ-метанол-аммиак (8 : 1.75 : 0.25),  $R_f$  0.01, этилацетат-ацетон-50%-ная  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (2 : 1 : 1),  $R_f$  0.38 и хлороформ-метанол-аммиак (6 : 4 : 1),  $R_f$  0.69. Выход 96% (1.32 г, 5.93 ммоль).

**4. Получение ди-Вос-Тур-D-Ala-Phe-Gly.** 4.83 г (10.68 ммоль) ди-Вос-Тур-D-Ala растворяли в 44 мл ацетонитрила, добавляли 1.6 мл (11.75 ммоль) триэтиламина, охлаждали до -20°C и прибавляли 1.45 мл (11.75 ммоль) хлорангидрида триметилуксусной кислоты. Смесь выдерживали при -10°C 20 мин, охлаждали до -20°C, прибавляли охлажденный до -20°C раствор 2.85 г

(12.82 ммоль) *Phe-Gly* в 44 мл ацетонитрила, 6.5 мл воды и 1.8 мл (12.82 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при  $-20^{\circ}\text{C}$ , 2 ч при комнатной температуре, упаривали, подкисляли водный раствор пятикратным избытком  $\text{NaHSO}_4$ , экстрагировали этилацетатом ( $5 \times 60$  мл). Объединенные фракции этилацетата промывали водой, 10%-ным раствором  $\text{KHSO}_4$ , водой, сушили над  $\text{MgSO}_4$ , упаривали. Переосаждали из эфира, сушили в вакууме. Остаток анализировали ТСХ в системе ацетон-бензол-уксусная кислота (2 : 1 : 1),  $R_f$  0.35. Выход 81% (5.71 г, 8.69 ммоль).

*Синтез Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-D-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> и Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-L-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>*

**1. Получение ди-Вос-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-OMe.** 670 мг (1.02 ммоль) ди-Вос-Tyr-D-Ala-Phe-Gly растворяли в диметилформамиде (ДМФА), прибавляли 151.5 мг (1.12 ммоль) 1-гидроксibenзотриазола (НОВТ), охлаждали до  $0^{\circ}\text{C}$ , прибавляли 253.4 мг (1.12 ммоль) ДЦГК, перемешивали 30 мин на магнитной мешалке, прибавляли 546.6 мг (1.22 ммоль)  $2\text{HCl} \cdot \text{Tyr-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-OMe}$  и 0.34 мл (2.45 ммоль) триэтиламина в ДМФА. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при охлаждении и 2 сут при комнатной температуре. Реакционную смесь отфильтровывали, упаривали, добавляли 100 мл этилацетата, промывали водой, 10%-ным раствором  $\text{KHSO}_4$ , водой, 5%-ным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, насыщенным раствором  $\text{NaCl}$ . Сушили над  $\text{MgSO}_4$ . Затем отфильтровывали и упаривали. Переосаждали остаток из этилацетата гексаном, сушили в вакууме. Остаток анализировали ТСХ в системах хлороформ-метанол-уксусная кислота (42 : 7 : 1),  $R_f$  0.77, хлороформ-метанол-аммиак (8 : 1.75 : 0.25),  $R_f$  0.88, хлороформ-метанол (9 : 1),  $R_f$  0.8, этанол-аммиак (7 : 3),  $R_f$  0.26. Выход 40% (410 мг, 0.41 ммоль), т.пл.  $142^{\circ}\text{C}$ .

**2. Получение ди-Вос-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>.** 410 мг (0.41 ммоль) полученного ди-Вос-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-OMe обрабатывали метанолом, насыщенным аммиаком и оставляли на 2 сут при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем реакционную смесь упаривали 2 раза с этилацетатом, 2 раза с абсолютным метанолом; высаживали из абсолютного метанола эфира. Остаток анализировали ТСХ в системах хлороформ-метанол-аммиак (6 : 4 : 1),  $R_f$  0.69, хлороформ-метанол (9 : 1),  $R_f$  0.09. Выход 52% (208.5 мг, 0.212 ммоль).

**3. Получение Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>.** К 208.5 мг (0.212 ммоль) ди-Вос-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> прибавляли 15 мкл анизола, 0.64 мл раствора 1 моль/л  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$ , выдерживали при комнатной температуре 45 мин, упаривали.

Переосаждали из абсолютного метанола этилацетатом. Остаток анализировали ТСХ в системах изопропанол-муравьиная кислота-вода (20 : 1 : 5),  $R_f$  0.79, хлороформ-метанол-аммиак (6 : 4 : 1),  $R_f$  0.93, хлороформ-метанол-аммиак (7 : 2.5 : 0.5),  $R_f$  0.20 и хлороформ-метанол-аммиак (8 : 1.75 : 0.25),  $R_f$  0.06. Выход 52% (190 мг, 0.193 ммоль).

**4. Получение Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-L-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> и Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-D-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>.** Разделение *L*- и *D*-изомеров проводили методом колоночной хроматографии. 120 мг полученных диастереомеров (Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>) растворяли в 1 мл метанола, наносили на 2 г силикагеля L 40/100 мкм, предварительно обработанного хлороформом, насыщенным аммиаком. Деление проводили на колонке диаметром 19 мм (носитель Silasorb 600 [LC]), приготовленной в гексане. При делении использовали ступенчатый градиент (хлороформ-насыщенный аммиак-метанол). Фракции, содержащие пептиды, упаривали, растворяли в метаноле, добавляли 0.2 мл 2 моль/л  $\text{HCl}$ , высаживали абсолютным этилацетатом, осадок отфильтровывали, сушили в вакууме. Пептиды анализировали ТСХ в системе хлороформ-метанол-аммиак (7 : 2.5 : 0.5),  $R_f$  0.23. Выход 75% (50 и 40 мг соответственно).

*Синтез Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-L-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub> и Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-D-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub>*

**1. Получение Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-L-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub>.** В реакционную ампулу помещали 5 мг Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-L-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>, 0.2 мл метанола, 10 мкл уксусной кислоты и 35 мг оксида палладия. Содержимое ампулы замораживали жидким азотом, вакуумировали до давления 0.1 Па и напускали газообразный тритий до давления 400 гПа. Реакцию вели при перемешивании 16 ч. Затем содержимое ампулы вновь замораживали жидким азотом и удаляли избыточный тритий вакуумированием до давления 0.1 Па. Катализатор отфильтровывали и промывали метанолом. Метанольный раствор упаривали, затем упаривали с метанолом ( $3 \times 2$  мл) для удаления лабильного трития, остаток очищали методом ВЭЖХ на колонке Kromasil 100 C<sub>18</sub>  $8 \times 150$  мм,  $v = 2$  мл/мин, система  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{CH}_3\text{OH}-50$  ммоль/л аммонийфосфатный буфер (pH 2.8) (95 : 1.8 : 3.2), время удерживания 7.2 мин. Выход 15%, молярная радиоактивность 10.8 Ки/ммоль.

**2. Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-D-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub>** получали аналогично исходя из 5 г Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-D-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> и выделяли в тех же условиях. Время удерживания 8.7 мин. Выход 11%, молярная радиоактивность 11.2 Ки/ммоль.

**3. Получение Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-L-[3,4-**

<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub>. В реакционную ампулу помещали 1 мг ди-Вос-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-L-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>, 0.2 мл абсолютного диоксана и 10 мг 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>. Содержимое ампулы замораживали жидким азотом, вакуумировали до давления 0.1 Па и напускали газообразный тритий до давления 400 гПа. Реакцию вели при перемешивании 16 ч. Затем содержимое ампулы вновь замораживали жидким азотом и удаляли избыточный тритий вакуумированием до давления 0.1 Па. Катализатор отфильтровывали и промывали метанолом. Метанольный раствор упаривали, затем упаривали с метанолом (3 × 2 мл) для удаления лабильного трития, ди-Вос-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-L-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub> растворяли в 0.5 мл 1 моль/л HCl/MeOH и вели реакцию 75 мин при перемешивании (около 78% метки в реакционной смеси находилось в Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-L-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub>). Раствор упаривали, остаток очищали методом ВЭЖХ в тех же условиях, что и в п. 1. Время удерживания 7.2 мин. Выход 32%, молярная радиоактивность 60–70 Ки/ммоль.

4. Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-D-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub> получали аналогично исходя из 1 мг ди-Вос-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-3,4-дегидро-D-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>. Около 70% метки в реакционной смеси находилось в Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-D-[3,4-<sup>3</sup>H]Pro-Ser-NH<sub>2</sub>. Раствор упаривали, остаток очищали методом ВЭЖХ в тех же условиях, что и в п. 1. Время удерживания 8.7 мин. Выход 20%, молярная радиоактивность 60–70 Ки/ммоль.

#### Синтез di-Вос-Tyr-Pro

1. Получение ди-Вос-Tyr-Pro-OBzl. 4.7 г (12.32 ммоль) ди-Вос-Tyr растворяли в 100 мл CH<sub>3</sub>CN, к раствору добавляли 2.0 г (14.78 ммоль) НОВТ, охлаждали до 0°C и добавляли 3.34 г (14.78 ммоль) ДЦГК. Перемешивали 1 ч на магнитной мешалке при 0°C. Затем к реакционной смеси добавляли ранее приготовленный и охлажденный раствор 13.6 г (14.78 ммоль) HCl-Pro-OBzl с 2.1 мл (14.78 ммоль) триэтиламина в 50 мл CH<sub>3</sub>CN (рН раствора должен быть 8–9). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 3 сут при комнатной температуре. Реакционную смесь отфильтровывали, упаривали, к упаренному остатку добавляли 300 мл этилацетата. Этилацетатный раствор промывали водой (3 × 20 мл), 10%-ным раствором KHSO<sub>4</sub> (3 × 20 мл), водой (3 × 20 мл), 5%-ным раствором NaHCO<sub>3</sub> (3 × 20 мл), водой (3 × 20 мл) и 20 мл насыщенного раствора NaCl. Раствор этилацетата сушили 30 мин над прокаленным MgSO<sub>4</sub>. Высушенный этилацетатный раствор отфильтровывали, упаривали. Остаток растворяли в эфире и высаживали гексаном. Полученный продукт сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, KOH и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системах хлороформ-метанол (9:1), R<sub>f</sub> 0.92, ацетон-бензол-

CH<sub>3</sub>COOH (50:100:1), R<sub>f</sub> 0.80, бензол-этанол (8:2), R<sub>f</sub> 0.75. Выход 68% (4.80 г, 8.44 ммоль), т.пл. 98–100°C, [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = +15.3 (c = 1 моль/л, метанол).

2. Получение ди-Вос-Tyr-Pro. 4.8 г (8.44 ммоль) ди-Вос-Tyr-Pro-OBzl растворяли в 100 мл метанола, прибавляли 0.5 мл CH<sub>3</sub>COOH и 0.5 г палладиевой черни и, перемешивая на магнитной мешалке, пропускали водород в течение 2 ч. Раствор отфильтровывали, упаривали, добавляли бензол (2 × 30 мл) и вновь упаривали, затем растворяли в 10 мл эфира. Реакционную смесь обрабатывали 30 мл гексана, при этом выпадал осадок. Гексан декантировали, а осадок в колбе сушили в эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системах хлороформ-метанол (9:1), R<sub>f</sub> 0.58, бензол-этанол (8:2), R<sub>f</sub> 0.54, ацетон-бензол-уксусная кислота (50:100:1), R<sub>f</sub> 0.55. Выход 88% (3.57 г, 7.46 ммоль), т.пл. 101–103°C, [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = +9.3 (c = 1 моль/л, метанол).

#### Синтез Вос-Phe-Val

15 г (56.5 ммоль) Вос-Phe растворяли в 100 мл ацетонитрила и охлаждали до -5°C. К охлажденному раствору прибавляли 8.7 мл (62.15 ммоль) триэтиламина, охлаждали до -20°C, перемешивая на магнитной мешалке. К охлажденному раствору прибавляли 7.64 мл (62.15 ммоль) хлорангидрида триметилуксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке 20 мин при -10°C (до образования смешанного ангидрида). Реакционную смесь охлаждали до -30°C и прибавляли к ней охлажденный до -20°C раствор 7.94 г (67.8 ммоль) Val в 30 мл воды, 100 мл ацетонитрила и 9.5 мл (67.8 ммоль, до рН 8–9) триэтиламина. Реакцию вели 1 ч при -10°C и 2 ч при 18–20°C, перемешивая на магнитной мешалке. Реакционную смесь упаривали. К остатку прибавляли 20 мл воды, водный раствор подкисляли 47 г (339 ммоль) NaHSO<sub>4</sub> до рН 3. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (5 × 100 мл). Объединенные вытяжки промывали водой (2 × 20 мл), 10%-ным раствором KHSO<sub>4</sub> (2 × 20 мл), водой (2 × 20 мл), сушили над прокаленным MgSO<sub>4</sub>, упаривали. Полученный продукт переосаждали несколько раз из эфира гексаном. Сушили под вакуумом в эксикаторе над KOH. Остаток анализировали ТСХ в системах хлороформ-метанол (9:1), R<sub>f</sub> 0.57, бутанол-уксусная кислота-вода (5:1:2), R<sub>f</sub> 0.89, хлороформ-метанол-аммиак (8:1.75:0.25), R<sub>f</sub> 0.45, ацетон-бензол-уксусная кислота (50:100:1), R<sub>f</sub> 0.49, бензол-этанол (8:2), R<sub>f</sub> 0.37. Выход 70% (14.46 г, 39.7 ммоль), т.пл. 76–78°C, [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -6.0 (c = 1 моль/л, метанол).

#### Синтез TFA·Glu(OBzl)Pro-Ile-OBzl и TFA·Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl

1. Получение Ts-Ile-OBzl. В круглодонную колбу емкостью 250 мл, снабженную насадкой

Дина-Старка и обратным холодильником, помещали 6.56 г (50 ммоль) *Pe*, 10.46 г (55 ммоль) *n*-толуолсульфокислоты (TsOH), 100 мл бензилового спирта, 50 мл бензола. Кипятили при перемешивании 4 ч. За это время отгонялся азеотроп бензола с водой. Раствор должен быть прозрачным. За время реакции 3 раза добавляли по 50 мл бензола. Когда отгонка воды прекратилась, реакционную смесь охлаждали и прибавляли 400 мл гексана. При добавлении гексана выпадал осадок, который отфильтровывали, промывали на фильтре гексаном и сушили в вакууме. Высушенный осадок растворяли в абсолютном метаноле, к которому прибавляли сухой эфир. Оставляли на несколько часов для кристаллизации. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, многократно промывая кристаллический осадок на фильтре сухим эфиром. Полученное вещество сушили в вакууме над  $P_2O_5$ , KOH и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системе бутанол-уксусная кислота-вода (5 : 1 : 2),  $R_f$  0.48. Выход 76% (14.98 г, 38.0 ммоль), т.пл. 152–154°C,  $[\alpha]_D^{22} = -0.1$  ( $c = 2$  моль/л, метанол).

**2. Получение *Woc-Pro-Pe-OBzl*.** 8.29 г (38.5 ммоль) *Woc-Pro* растворяли в 100 мл  $CH_3CN$ , охлаждали до -5°C. К охлажденному раствору прибавляли 5.93 мл триэтиламина (42.35 ммоль), охлаждали до -20°C, перемешивая на магнитной мешалке. К охлажденному раствору прибавляли 5.2 мл (42.35 ммоль) хлорангидрида триметилуксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке 20 мин при -10°C (до образования смешанного ангидрида). Реакционную смесь охлаждали до -30°C и прибавляли к ней охлажденный до -20°C раствор 18.2 г (46.2 ммоль) *Ts-Pe-OBzl* в 200 мл ацетонитрила и 9.5 мл (46.2 ммоль, до pH 8–9) триэтиламина. Реакцию вели 1 ч при -10°C и 2 ч при 18–20°C, перемешивая на магнитной мешалке. Реакционную смесь упаривали. К упаренному остатку прибавляли 400 мл этилацетата. Этилацетатный раствор промывали водой (3 × 20 мл), 10%-ным раствором  $KHSO_4$  (3 × 20 мл), 5%-ным раствором  $NaHCO_3$  (3 × 20 мл), водой (3 × 20 мл) и 20 мл насыщенного раствора NaCl. Раствор этилацетата сушили 30 мин над прокаленным  $MgSO_4$ . Высушенный этилацетатный раствор отфильтровывали, упаривали. Полученное после упаривания масло 2 раза упаривали с бензолом, 2 раза с сухим эфиром. Продукт в виде масла сушили в вакууме над  $P_2O_5$ , KOH и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системах ацетон-бензол-уксусная кислота (50 : 100 : 1),  $R_f$  0.70, бензол-этанол (8 : 2),  $R_f$  0.59 и хлороформ-метанол (9 : 1),  $R_f$  0.95. Выход 72% (11.68 г, 27.9 ммоль).

**2\*. *Woc-3,4-дегидро-L-Pro-Pe-OBzl*** синтезировали аналогично исходя из 83 мг *Woc-3,4-дегидро-L-Pro*. Выход 115 мг.

**3. Получение *TFA-Pro-Pe-OBzl*.** К 11.68 г (27.9 ммоль) *Woc-L-Pro-Pe-OBzl* прибавляли 69.8 мл хлористого метилена и 69.8 мл трифторуксусной кислоты (TFA), выдерживали 45 мин при комнатной температуре, после снятия защитной группы раствор два раза упаривали с абсолютным метанолом, два раза с бензолом, два раза с эфиром, остаток растворяли в минимальном объеме бензола и высаживали гексаном. Гексан декантировали, а полученное масло сушили в вакууме над  $P_2O_5$ , KOH и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системах ацетон-бензол-уксусная кислота (50 : 100 : 1),  $R_f$  0.16, хлороформ-метанол (9 : 1),  $R_f$  0.30, хлороформ-метанол-аммиак (8 : 1.75 : 0.25),  $R_f$  0.93. Выход 99%.

**3\*. *TFA-3,4-дегидро-L-Pro-Pe-OBzl*** синтезировали аналогично исходя из 115 мг *Woc-3,4-дегидро-L-Pro-Pe-OBzl*. Выход 117 мг.

**4. Получение *Woc-Glu(OBzl)-Pro-Pe-OBzl*.** 10.0 г (29.85 ммоль) *Woc-Glu(OBzl)-OH* растворяли в 150 мл ацетонитрила, к раствору добавляли 4.84 г (35.82 ммоль) НОВТ, охлаждали до 0°C и добавляли 8.1 г (35.82 ммоль) ДЦГК. Перемешивали 1 ч на магнитной мешалке при 0°C. Затем к реакционной смеси добавляли охлажденный до 0°C раствор 27.62 ммоль *TFA-Pro-Pe-OBzl* в 75 мл ацетонитрила и 7.8 мл (55.8 ммоль) триэтиламина (pH раствора должен быть 8–9). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 3 сут при комнатной температуре. Реакционную смесь отфильтровывали, упаривали, к упаренному остатку добавляли 400 мл этилацетата. Этилацетатный раствор промывали водой (3 × 20 мл), 10%-ным раствором  $KHSO_4$  (3 × 20 мл), водой (3 × 20 мл), 5%-ным раствором  $NaHCO_3$  (3 × 20 мл), водой (3 × 20 мл) и 20 мл насыщенного раствора NaCl. Раствор этилацетата сушили 30 мин над прокаленным  $MgSO_4$ . Высушенный этилацетатный раствор отфильтровывали, упаривали. Остаток высаживали из эфира гексаном. Полученный продукт сушили в вакууме над  $P_2O_5$ , KOH и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системах ацетон-бензол-уксусная кислота (50 : 100 : 1),  $R_f$  0.71, бензол-этанол (8 : 2),  $R_f$  0.84. Выход 85% (14.7 г, 23.0 ммоль), т.пл. 74–76°C,  $[\alpha]_D^{22} = -12.04$  ( $c = 1$  моль/л, метанол).

**4\*. *Woc-Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Pe-OBzl*** синтезировали аналогично исходя из 117 мг *TFA-3,4-дегидро-L-Pro-Pe-OBzl*. Выход 145 мг.

**5. Получение *TFA-Glu(OBzl)-Pro-Pe-OBzl*.** К 14.7 г (23.0 ммоль) *Woc-Glu(OBzl)-Pro-Pe-OBzl* прибавляли 57.5 мл хлористого метилена и 57.7 мл TFA, выдерживали 45 мин при комнатной температуре, после снятия защитной группы раствор два раза упаривали с абсолютным метанолом, два раза с бензолом, два раза с эфиром. Остаток растворяли в минимальном объеме бензола и высаживали гексаном. Гексан декантировали, а полу-

ченное масло сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, КОН и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системах бензол-этанол (8 : 2), R<sub>f</sub> 0.34, хлороформ-метанол (9 : 1), R<sub>f</sub> 0.14, хлороформ (насыщенный аммиаком)-метанол (9 : 1), R<sub>f</sub> 0.544. Выход 97.8% (14.66 г, 22.5 ммоль).

**5\***. TFA·Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl синтезировали аналогично исходя из 145 мг Boc-Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl. Выход 144 мг.

Синтез HCl·Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile и HCl·Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-3,4-дегидро-L-Pro-Ile

**1. Получение Boc-Phe-Val-Glu(OBzl)-Pro-Ile-OBzl.** 9.0 г (24.70 ммоль) Boc-Phe-Val растворяли в 100 мл ацетонитрила, к раствору добавляли 4.0 г (29.7 ммоль) НОВТ, охлаждали до 0°C и добавляли 6.7 г (29.7 ммоль) ДЦГК. Перемешивали 1 ч на магнитной мешалке при 0°C. Затем к реакционной смеси добавляли охлажденный до 0°C раствор 14.66 г (22.5 ммоль) TFA·Glu(OBzl)-Pro-Ile-OBzl в 50 мл ацетонитрила и 6.3 мл (45 ммоль) триэтиламина (рН раствора должен быть 8-9). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 3 сут при комнатной температуре. Реакционную смесь отфильтровывали, упаривали, остаток растворяли в 300 мл этилацетата. Этилацетатный раствор промывали водой (3 × 20 мл), 10%-ным раствором KHSO<sub>4</sub> (3 × 20 мл), водой (3 × 20 мл), 5%-ным раствором NaHCO<sub>3</sub> (3 × 20 мл), водой (3 × 20 мл) и 20 мл насыщенного раствора NaCl. Раствор этилацетата сушили 30 мин над прокаленным MgSO<sub>4</sub>. Высушенный этилацетатный раствор отфильтровывали, упаривали. Остаток высаживали из эфира гексаном. Полученный продукт сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, КОН и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системах ацетон-бензол-уксусная кислота (50 : 100 : 1), R<sub>f</sub> 0.57, бензол-этанол (8 : 2), R<sub>f</sub> 0.70, хлороформ-метанол (9 : 1), R<sub>f</sub> 0.74. Выход 81% (16.18 г, 18.3 ммоль), т.пл. 71-72°C, [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -58.82 (c = 1 моль/л, метанол).

**1\***. Boc-Phe-Val-Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl синтезировали аналогично исходя из 144 мг TFA·Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl. Выход 159 мг.

**2. Получение TFA·Phe-Val-Glu(OBzl)-Pro-Ile-OBzl.** К 10.0 г (11.3 ммоль) Boc-Phe-Val-Glu(OBzl)-Pro-Ile-OBzl прибавляли 28.3 мл хлористого метилена и 28.3 мл TFA, выдерживали 45 мин при комнатной температуре, после снятия защитной группы раствор два раза упаривали с абсолютным метанолом, два раза с бензолом, два раза с эфиром, остаток дважды переосаждали из этилацетата гексаном. Полученный продукт сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, КОН и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системах ацетон-бензол-уксусная кислота (50 : 100 : 1), R<sub>f</sub> 0.04, бен-

зол-этанол (8 : 2), R<sub>f</sub> 0.36, хлороформ-метанол (9 : 1), R<sub>f</sub> 0.35, хлороформ (насыщенный аммиаком)-метанол (9 : 1), R<sub>f</sub> 0.73. Выход 95% (9.64 г, 10.74 ммоль), т.пл. 81-83°C, [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -3.7 (c = 1 моль/л, метанол).

**2\***. TFA·Phe-Val-Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl синтезировали аналогично исходя из 159 мг Boc-Phe-Val-Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl. Выход 153 мг.

**3. Получение ди-Boc-Tyr-Pro-Phe-Val-Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl.** 3.5 г (7.3 ммоль) ди-Boc-Tyr-Pro растворяли в 50 мл ацетонитрила, к раствору добавляли 1.2 г (8.76 ммоль) НОВТ, охлаждали до 0°C и добавляли 1.9 г (8.76 ммоль) ДЦГК. Перемешивали 1 ч на магнитной мешалке при 0°C. Затем к реакционной смеси добавляли охлажденный до 0°C раствор 5.9 г (6.6 ммоль) TFA·Phe-Val-Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl в 50 мл ацетонитрила и 0.93 мл (6.6 ммоль) триэтиламина (рН раствора должен быть 8-9). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 3 сут при комнатной температуре. Реакционную смесь отфильтровывали, упаривали, остаток растворяли в 300 мл этилацетата. Этилацетатный раствор промывали водой (3 × 20 мл), 10%-ным раствором KHSO<sub>4</sub> (3 × 20 мл), водой (3 × 20 мл), 5%-ным раствором NaHCO<sub>3</sub> (3 × 20 мл), водой (3 × 20 мл) и 20 мл насыщенного раствора NaCl. Раствор этилацетата сушили 30 мин над прокаленным MgSO<sub>4</sub>. Высушенный этилацетатный раствор отфильтровывали, упаривали. Остаток высаживали из эфира гексаном. Полученный продукт сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, КОН и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системах ацетон-бензол-уксусная кислота (50 : 100 : 1), R<sub>f</sub> 0.50, бензол-этанол (8 : 2), R<sub>f</sub> 0.56, хлороформ-метанол (9 : 1), R<sub>f</sub> 0.74. Выход 88% (7.2 г, 5.8 ммоль), т.пл. 103-104°C, [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -61.54 (c = 1 моль/л, метанол).

**3\***. Ди-Boc-Tyr-Pro-Phe-Val-Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl синтезировали аналогично исходя из 153 мг TFA·Phe-Val-Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl. Выход 186 мг.

**4. Получение ди-Boc-Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile.** 7.0 г (5.6 ммоль) ди-Boc-Tyr-Pro-Phe-Val-Glu(OBzl)-Pro-Ile-OBzl растворяли в 100 мл метанола, прибавляли 0.5 мл CH<sub>3</sub>COOH и палладиевую чернь и, перемешивая на магнитной мешалке, пропускали водород 2 ч. Раствор отфильтровывали, упаривали, растворяли и упаривали с бензолом (2 × 20 мл), с 20 мл этилацетата, добавляли 10 мл этилацетата и кристаллизовали при добавлении гексана, осадок сушили в эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/КОН и парафином. Пептид анализировали методом ТСХ в системе хлороформ-метанол (9 : 1), R<sub>f</sub> 0.35. Выход 93% (5.54 г, 5.2 ммоль), т.пл. 115-116°C, [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -61.54 (c = 1 моль/л, метанол).

**4\*. Получение ди-Вос-Тур-Про-Пхе-Вал-Глу-3,4-дегидро-L-Про-Пе.** 180 мг ди-Вос-Тур-Про-Пхе-Вал-Глу(OBzl)-3,4-дегидро-L-Про-Пе-OBzl растворяли в 0.8 мл раствора 0.25 моль/л NaOH в смеси диоксана с водой (6 : 1) 2 ч при 20°C, перемешивая на магнитной мешалке. Диоксан упаривали, растворяли в 1 мл воды, экстрагировали этилацетатом (3 × 0.5 мл). Водную фазу подкисляли 5% -ным раствором KHSO<sub>4</sub> и экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл). Органическую фазу промывали водой (3 × 0.5 мл) до нейтральной реакции и упаривали. Остаток упаривали с бензолом (3 × 2 мл) и сушили над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Пептид анализировали и очищали методом ТСХ в системе хлороформ-метанол (9 : 1), R<sub>f</sub> 0.35. Выход 37% (57 мг).

**5. Получение Тур-Про-Пхе-Вал-Глу-Про-Пе.** К 2.0 г (1.9 ммоль) ди-Вос-Тур-Про-Пхе-Вал-Глу-Про-Пе прибавляли 5.6 мл 1 моль/л HCl/CH<sub>3</sub>COOH, выдерживали 45 мин при комнатной температуре. После снятия защитных групп вещество высаживали гексаном, гексан декантировали, а полученное вещество сушили в вакууме. Высушенное вещество растворяли в 5 мл абсолютного метанола и пересаждали сухим эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали, сушили в эксикаторе под вакуумом над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, KOH и парафином. Остаток анализировали ТСХ в системах хлороформ-метанол-аммиак (6.5 : 3.0 : 0.5), R<sub>f</sub> 0.21, хлороформ-метанол-аммиак (6 : 4 : 1), R<sub>f</sub> 0.93, бутанол-уксусная кислота-вода (5 : 2 : 1), R<sub>f</sub> 0.18, бутанол-уксусная кислота-пиридин-вода (30 : 6 : 20 : 24), R<sub>f</sub> 0.66. Выход 90% (1.5 г, 1.69 ммоль), т.пл. 103–105°C,  $[\alpha]_D^{22} = -0.2$  (c = 1 моль/л, метанол).

**5\*. Тур-Про-Пхе-Вал-Глу-3,4-дегидро-L-Про-Пе** синтезировали аналогично исходя из 55 мг ди-Вос-Тур-Про-Пхе-Вал-Глу-3,4-дегидро-L-Про-Пе. Выход 41 мг.

#### *Синтез Тур-Про-Пхе-Вал-Глу-L-[3,4-<sup>3</sup>H]Про-Пе*

В реакционную ампулу помещали 6 мг Тур-Про-Пхе-Вал-Глу-3,4-дегидро-L-Про-Пе, 0.4 мл метанола, 20 мкл уксусной кислоты и 42 мг оксида палладия. Содержимое ампулы замораживали жидким азотом, вакуумировали до давления 0.1 Па и напускали газообразный тритий до давления 400 гПа. Реакцию вели при перемешивании 16 ч. Затем содержимое ампулы вновь замораживали жидким азотом и удаляли избыточный тритий вакуумированием до давления 0.1 Па. Катализатор отфильтровывали и промывали метанолом. Метанольный раствор упаривали, затем упаривали с метанолом (3 × 2 мл) для удаления лабильного трития, остаток очищали методом ВЭЖХ на колонке Kromasil 100 C<sub>18</sub> 8 × 150 мм, v = 1 мл/мин, система ацетонитрил-метанол-50 ммоль/л аммонийфосфатный буфер (pH 2.8) (20 : 40 : 100), время удерживания 18.85 мин. Выход 40%, молярная радиоактивность 10 Ки/ммоль.

Гидрирование 1 мг ди-Вос-Тур-Про-Пхе-Вал-Глу(OBzl)-3,4-дегидро-L-Про-Пе-OBzl в присутствии 0.2 мл абсолютного диоксана и 10 мг 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> проводили аналогично. Остаток после удаления лабильного трития растворяли в 0.5 мл метанола и снимали бензильную защиту в присутствии 30 мг палладиевой черни и 10 мкл CH<sub>3</sub>COOH при перемешивании на магнитной мешалке и пропускании водорода в течение 2 ч. Раствор отфильтровывали, упаривали, растворяли ди-Вос-Тур-Про-Пхе-Вал-Глу-L-[3,4-<sup>3</sup>H]Про-Пе в 0.5 мл 1 моль/л HCl/MeOH и вели реакцию 75 мин при перемешивании. Раствор упаривали, остаток очищали методом ВЭЖХ в тех же условиях, что и после гидрирования незащищенного пептида. Время удерживания 18.85 мин. Выход 20%, молярная радиоактивность 50–60 Ки/ммоль.

#### **Результаты и обсуждение**

Данные, полученные в последнее десятилетие, показали, что продукты гидролиза казеинов могут участвовать в регуляции процессов поступления и всасывания питательных веществ, влиять на моторику и секрецию желудочно-кишечного тракта; оказывать антигипертензивный эффект, ингибировать агрегацию тромбоцитов, участвовать в минеральном обмене, стимулировать пролиферацию лимфоцитов и фагоцитарную активность макроорганов человека [16, 17].

Кроме влияния на моторику и тонус гладких мышечных волокон β-казоморфины способны управлять и другими аспектами деятельности желудочно-кишечного тракта. Имеется в виду в первую очередь изменение после введения пептидов этой группы транспортной функции кишечного эпителия [18, 19]. Есть данные о действии β-казоморфинов на эндокринную систему, об их влиянии на выделение инсулина и соматостатина [20, 21].

При исследовании физиологических эффектов дерморфина и его аналогов оказалось, что модификация молекулы дерморфина в четвертом и шестом положениях приводит к существенным изменениям уровня анальгетической и терморегуляторной активности исходного пептида [22]. Последнее обстоятельство позволяет надеяться на возможность использования этих производных дерморфина при лечении ряда заболеваний, так как они сочетают в себе высокую анальгетическую активность с различным уровнем терморегуляторной и/или сосудодвигательной активности, и/или с влиянием на поведенческую реакцию испытуемого.

Дальнейшее исследование перечисленных выше пептидов (фармакокинетики, распределения в органах и клетках живых организмов, детализация их клеточного метаболизма и количественный анализ в биологических пробах для изучения их



концентрации в норме и патологии) невозможно без использования их меченных тритием аналогов.

Поэтому в данной работе была поставлена и решена задача синтеза меченых дерморфинов, молекулы которых были модифицированы в четвертом и шестом положениях, и человеческого β-казоморфина.

Как уже отмечалось, сочетание ступенчатого метода наращивания пептидной цепи с фрагментной конденсацией до настоящего времени является единственным методом, который гарантирует надежный полный синтез конечного продукта [11]. Поэтому ненасыщенные предшественники синтезировали с использованием этих методик. При синтезе применяли метод смешанных ангидридов и карбодиимидный метод с нуклеофильной добавкой [15].

Так, ненасыщенный предшественник дерморфина синтезировали конденсацией фрагментов ди-Вос-Тур-D-Ala-Phe-Gly и Тур-3,4-дегидро-DL-Pro-Ser-OMe с использованием классических методов пептидной химии. Фрагменты синтезировали с применением ТБА-метода с использованием тетрабутиламмонийных солей (ТБА-солей) и метода смешанных ангидридов с использованием хлорангидрида триметилуксусной кислоты. Для синтеза использовали производные D-, L-, DL-аминокислот. При синтезе фрагментов использовали как защищенные, так и свободные аминокислоты. ТБА-метод удобен при практическом применении (возможность использования при синтезе фрагментов незащищенных аминокислот, высокие скорости протекания реакции, легкость проведения синтеза, высокая чистота получаемых продуктов, удовлетворительные выходы, доступность реагентов). Аналогично при синтезе ненасыщенного человеческого β-казоморфина проводили конденсацию Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl, Вос-Phe-Val и ди-Вос-Тур-Pro.

В результате были синтезированы ненасыщенные предшественники человеческого β-казоморфина (Тур-Pro-Phe-Val-Glu-3,4-дегидро-L-Pro-Ile) и дерморфина (Тур-D-Ala-Phe-Gly-Тур-3,4-дегидро-L-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> и Тур-D-Ala-Phe-Gly-Тур-3,4-дегидро-D-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>).

Известно, что эти пептиды нерастворимы в апротонных растворителях, поэтому первая попытка ввести метку заключалась в обработке газообразным тритием в присутствии катализатора метанольных растворов этих пептидов. При этом были получены меченые препараты с молярной радиоактивностью не более 10–15 Ки/ммоль.

Для синтеза пептидов с более высокой молярной радиоактивностью в качестве исходных препаратов использовали предшественники, которые содержали защитные группы (ди-Вос-Тур-Pro-Phe-Val-Glu(OBzl)-3,4-дегидро-L-Pro-Ile-OBzl, ди-Вос-Тур-D-Ala-Phe-Gly-Тур-3,4-дегидро-D-Pro-Ser-NH<sub>2</sub> и ди-Вос-Тур-D-Ala-Phe-Gly-Тур-3,4-дегидро-L-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>). После восстановления двойной связи газообразным тритием в присутствии катализатора в апротонном растворителе и удаления защитных групп были получены меченые препараты с молярными радиоактивностями более 50 Ки/ммоль.

Работа поддержана грантом «Физико-химическая биология».

### Список литературы

- [1] Ашмарин И. П., Обухова М. Ф. // Биохимия. 1986. Т. 51, N 4. С. 531–546.
- [2] Ашмарин И. П. // Вопр. мед. химии. 1984. Т. 30, N 1. С. 2–7.
- [3] Ашмарин И. П., Каразеева Е. П. Нейрохимия. Изд-во Ин-та биомедицинской химии РАМН, 1996.
- [4] Broccardo M., Erspamer V., Falconieri E. G. et al. // Br. J. Pharmacol. 1981. Vol. 73, N 3. P. 625–631.
- [5] Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., Lottspeich F. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979. Vol. 360. P. 1211–1216.
- [6] Gross S. J. // N. Engl. J. Med. 1983. Vol. 308. P. 237–241.
- [7] Greenberg R., Groves M. L. // J. Dairy Res. 1979. Vol. 46, N 2. P. 235–239.
- [8] Wilmouth R. C., Clifton I. J. // Nat. Struct. Biol. 1997. Vol. 4, N 6. P. 456–462.
- [9] Volterra A., Restani P., Brunello N. et al. // Brain Res. 1986. Vol. 395, N 1. P. 25–30.
- [10] Шредер Э., Любке К. Пептиды. М.: Мир, 1967.
- [11] Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965.
- [12] Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды белки. М.: Мир, 1985.
- [13] Бодански М., Гросс Э., Джоунс Д. и др. Пептиды. Основные методы образования пептидных связей. М.: Мир, 1985.
- [14] Гершкович А. А., Кубишев В. К. Химический синтез пептидов. Киев: Наук. думка, 1992.
- [15] Andreeva L. A., Alfeeva L. Y., Potaman V. N., Nezavibat'ko V. N. // Int. J. Peptide Res. 1992. N 39. P. 493–496.
- [16] Meisel H., Frister H., Schlimme E. // Z. Ernährungswiss. 1989. Vol. 28, N 4. P. 267–278.
- [17] Meisel H., Bockelmann W. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. Vol. 76, N 1–4. P. 207–215.
- [18] Ermisch A. // Neurochemistry. 1983. Vol. 41, N 5. P. 1229–1233.
- [19] Zufarov K. A. // Biull. Eksp. Biol. Med. 1998. Vol. 125, N 1. P. 4–11.
- [20] Schusdziarra V., Schick A. // Endocrinology. 1983. Vol. 112, N 3. P. 885–889.
- [21] Schusdziarra V., Schick R. // Endocrinology. 1983. Vol. 112, N 6. P. 1948–1951.
- [22] Емельянова Т. Г., Батурина Е. Ю., Воскресенская О. Г. и др. // Докл. РАН. 1996. Т. 346, N 2. С. 271.