



УДК 547.964.4.057 : 577.175.325'17.017

## СИНТЕЗ [*cyclo*(Glu<sup>7</sup> → <sup>8</sup>Lys(Gly))]- АСТН-(5—14)-УНДЕКАПЕПТИДА.

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНАЛОГОВ АСТН-(5—10)- И АСТН-(5—14)-ПЕПТИДОВ

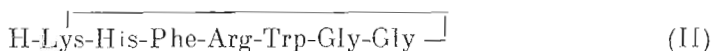
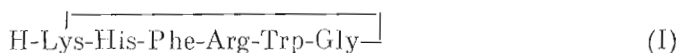
*Лиенкаула И. К., Скуиньш А. А., Романовский П. Я. \*,  
Порункевич Е. А., Раткевич М. П., Восекална И. А.,  
Гайлите Е. А., Чиненс Г. П.*

*Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига;*

*\* Экспериментальный завод ИОС АН ЛатвССР, Рига*

Синтезированы и исследованы циклический и соответствующий ему линейный фрагмент кортикотропина: [*cyclo*(Glu<sup>7</sup> → <sup>8</sup>Lys(Gly)) АСТН-(5—14)- и [Lys<sup>11</sup>(Gly)] АСТН-(5—14)-ундекапептиды. Циклическая структура фиксирована амидной связью между γ-СООН-группой глутаминовой кислоты и α-NH<sub>2</sub>-группой глицина, присоединенного к ε-NH<sub>2</sub>-группе лизина. В синтезе для конденсации фрагментов использованы азидный и карбодимидный методы. Циклизация осуществлена с помощью дифенилфосфорилзида. Меланоцитостимулирующая активность циклического аналога на изолированной коже лягушки на 2 порядка выше, чем у его линейного предшественника, в то время как стероидогенная активность в изолированных клетках надпочечников крысы на порядок ниже. Характеристики спектров КД циклических пептидов и их линейных предшественников в воде и трифторэтанолсходны, что указывает на подобие и сравнительную жесткость структур циклических и линейных соединений.

#### Исследование биологической активности циклических аналогов



специфического активного фрагмента кортикотропина H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH (кортикотропина-(5—10)) показало влияние размеров цикла на селективность и степень биологического ответа. Так, например, увеличение размера цикла в результате вставки остатка глицина при переходе от соединения (I), не проявляющего стероидогенную активность, к соединению (II) приводит к восстановлению стероидогенного эффекта до уровня активности линейного пептида АСТН-(5—10) (таблица) (замена остатка Glu<sup>5</sup> на Lys<sup>5</sup> в АСТН-(5—10)-гексапептиде мало влияет на стероидогенную активность [1] [2]. Замыкание цикла ковалентной связью между ε-NH<sub>2</sub>-группой лизина и СООН-группой С-концевого глицина, по-видимому, резко ограничивает возможность взаимодействия соединения (I) с соответствующими рецепторами на поверхности клеточных мембран, что и приводит к исчезновению стероидогенного эффекта, характерного для линейного АСТН-(5—10)-гексапептида [2]. С другой стороны, меланоцитостимулирующая активность соединения (I) на 2 порядка превышает активность его линейного предшественника [Lys<sup>5</sup>] АСТН-(5—10)-гексапептида (Ia) (таблица). Такое же соотношение для меланоцитостимулирующей активности сохраняется у соединения (II) и его линейного предшественника [Lys<sup>5</sup>] АСТН-(5—10)-Gly (IIa) (таблица) [2], что указывает на различную пространственную организацию активного фрагмента кор-

Сокращения: АСТН — кортикотропин, DMF — диметилформамид, ONb — *n*-нитробензил, ONSu — *N*-оксисукцинимид, DCC — *N,N'*-дициклогексилкарбодимид, НОВТ — 1-оксисбензотриазол, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография.

**Сравнение биологических свойств линейных и циклических аналогов АСТН-(5-10)- и АСТН-(5-14)-пептидов**

Соединение	Стероидогенная активность, МА *	Меланоцитостимулирующая активность, С <sub>30</sub> **
АСТН-(1-24)	1	2·10 <sup>-8</sup>
АСТН-(5-10)	(0,14-0,55)·10 <sup>-5</sup>	2·10 <sup>-4</sup>
(Ia)	—	10 <sup>-4</sup> ***
(I)	Неактивен	1,58·10 <sup>-5</sup>
(IIa)	—	10 <sup>-4</sup> ***
(II)	(0,27-1,08)·10 <sup>-5</sup>	1,58·10 <sup>-7</sup>
АСТН-(5-14) (IIIa)	—	0,8·10 <sup>-4</sup>
(III)	0,49·10 <sup>-5</sup>	1,25·10 <sup>-8</sup>
(XXVIa)	0,16·10 <sup>-4</sup>	0,40·10 <sup>-5</sup>
(XXVI)	0,20·10 <sup>-5</sup>	1·10 <sup>-7</sup>

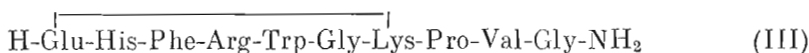
\* МА — ЕС<sub>50</sub> АСТН-(1-24)/ЕС<sub>50</sub> исследуемого вещества (см. «Экспер. часть»). ЕС<sub>50</sub> — концентрация исследуемого соединения, при которой достигается половина от максимального эффекта.

\*\* С<sub>30</sub> — концентрация пептидов (М), при которой достигается потемнение кожи на 30% (см. «Экспер. часть»).

\*\*\* Соединения в максимальных исследуемых концентрациях (до 10<sup>-1</sup> М) вызывали потемнение кожи не более чем на 20%.

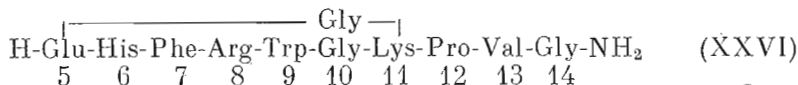
тикотропина при взаимодействии с рецепторами различных клеток-мишеней.

В продолжение работы нами был синтезирован циклоаналог

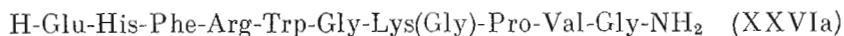


последовательности АСТН-(5-14) (IIIa), включающий в свой состав последовательности двух активных центров АСТН: (5-10) и (11-14) [3]. Соединение (III) проявляет как стероидогенную, так и меланоцитостимулирующую активности, причем для него и его линейного аналога (IIIa) сохраняется та же закономерность в проявлении активностей, которая существует в случае пептида (II) и его линейного предшественника (IIa) (таблица): стероидогенная активность сохраняется на уровне линейного аналога, а меланоцитостимулирующая активность — на 2-3 порядка выше, чем у линейного аналога.

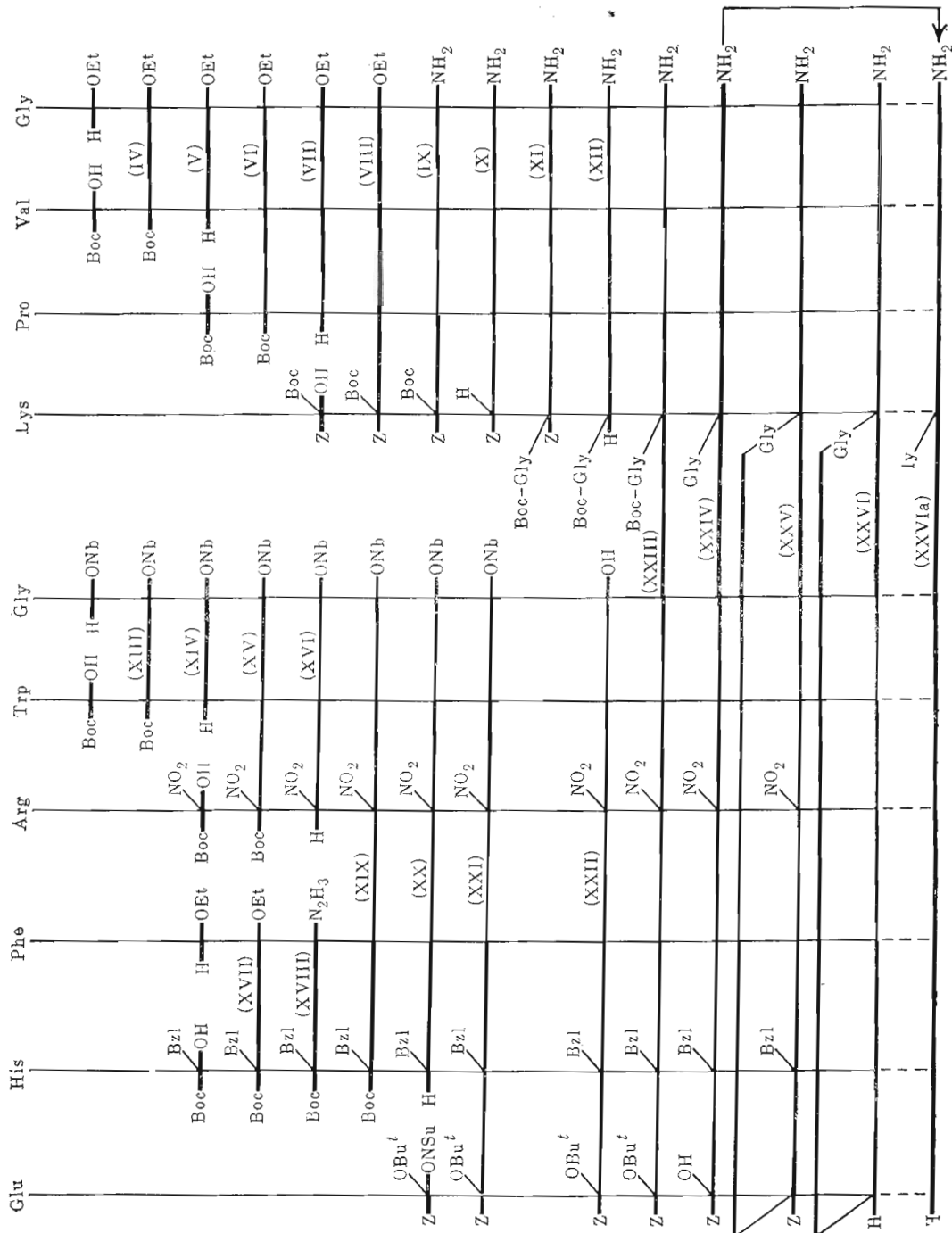
В настоящей работе осуществлен синтез и исследованы свойства циклического аналога фрагмента (5-14) кортикотропина, содержащего в своей полипептидной цепи последовательности обоих активных центров и имеющего увеличенный по сравнению с соединением (III) размер цикла за счет введения дополнительного остатка глицина между ε-NH<sub>2</sub>-группой лизина и γ-COOH-группой глутаминовой кислоты



Синтезирован также его линейный предшественник — фрагмент (5-14) кортикотропина с N<sup>ε</sup>-аминогруппой лизина, ацилированной глицином:



Синтез соединения (XXVI) осуществлен согласно схеме. Конденсацией Вос-His(Bzl)-Phe и Вос-Arg(NO<sub>2</sub>)-Trp-Gly-ONb азидным методом синтезировали пентапептид (XIX), к которому после удаления Вос-группы присоединяли Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-ONSu. Пентапептид (XII) получен постепенным наращиванием пептидной цепи карбодимидным методом, Вос-Gly введен в пептидную цепь методом сукцинимидных эфиров. После селективного удаления нитробензильной защитной группы [4] гекса- и пентапептидные фрагменты далее конденсировали карбодимидным методом. Внутримолекулярная циклизация проведена с помощью дифенилфосфорилзида [5] после селективного деблокирования γ-COOH-группы глутами-



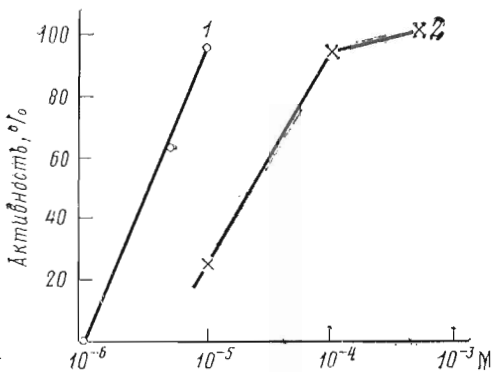


Рис. 1

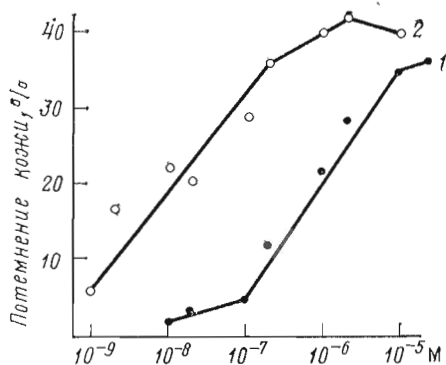


Рис. 2

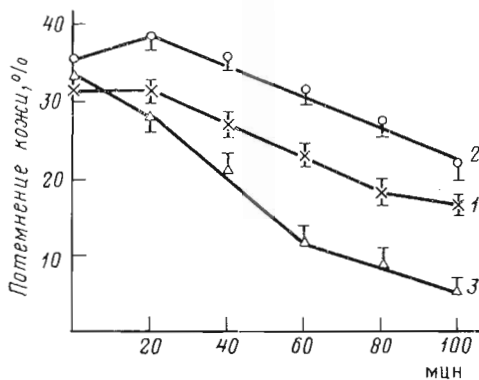


Рис. 3

Рис. 1. Стероидогенная активность соединений (XXVIa) (1) и (XXVI) (2) в изолированных клетках надпочечников крыс

Рис. 2. Меланоцитостимулирующая активность соединений (XXVIa) (1) и (XXVI) (2) в экспериментах *in vitro* на изолированной коже лягушки

Рис. 3. Сравнение длительности меланоцитостимулирующего действия АСТН-(1-24)-тетракозапептида (1), соединений (III) (2) и (XXVI) (3) в экспериментах *in vitro* на изолированной коже лягушки. Каждая точка представляет собой средний ответ ( $M \pm m$ ) из пяти экспериментов (по 5-8 кож в группе)

новой кислоты и  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группы глицина, присоединенного к  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группе лизина. После проведения циклизации защитные группы отщепляли каталитическим гидронолизом. Линейный ундекапептид (XXVIa) получен из промежуточного продукта (XXIV) после отщепления защитных групп каталитическим гидронолизом.

Промежуточные соединения (XV, XXIII, XXIV, XXV) очищали хроматографией на силикагеле, а целевые продукты (XXVI) и (XXVIa) — высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографией.

Циклическая структура пептида (XXVI) доказана присутствием в спектре <sup>1</sup>H-ЯМР резонансного сигнала амидного протона глицина в конце боковой цепи лизина ( $\delta$  8,39 м.д.).

Исследована специфическая биологическая активность синтезированных соединений: способность стимулировать биосинтез кортикостероидов в изолированных пучковых клетках надпочечников крыс, а также меланоцитостимулирующая активность *in vitro* на изолированной коже лягушки.

Результаты исследования стероидогенной активности [6] показали, что циклоаналог (XXVI) на порядок менее активен, чем его линейный предшественник (XXVIa) (рис. 1, таблица), т. е. в данном случае увеличение размера цикла по сравнению с соединением (III) не привело к увеличению стероидогенного эффекта, как это наблюдалось при переходе от соединения (I) к соединению (II) (таблица). С другой стороны, меланоцитостимулирующая активность циклоаналога (XXVI) на 2 порядка выше, чем у линейного пептида (XXVIa) (рис. 2), т. е. практически не отличается от активности соединения (III) (таблица). Однако результаты исследования длительности меланоцитостимулирующего эффекта циклопептидов (III) и (XXVI) в опытах на изолированной коже лягушки показали, что увеличение размера цикла в соединении (XXVI) приводит к снижению продолжительности эффекта, вызванного этим соединением по сравнению с соединением (III). Меланоцитостимулирующее действие пептидов

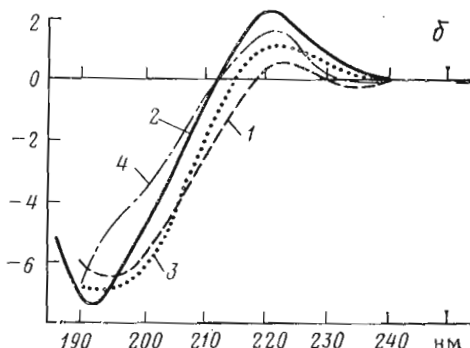
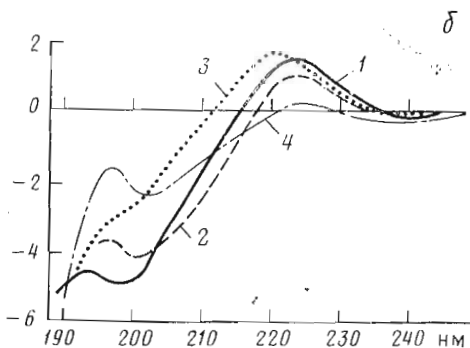
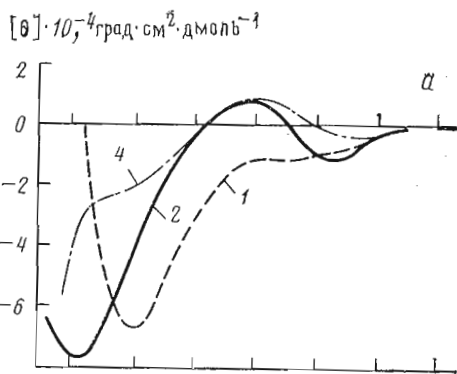
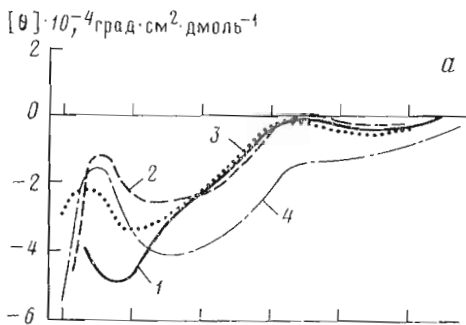


Рис. 4

Рис. 5

Рис. 4. Спектры КД соединений (Ia) (1), (I) (2), (IIa) (3) и (II) (4) в трифторэтаноле (а) и воде (б)

Рис. 5. Спектры КД соединений (IIIa) (1), (III) (2), (XXVIa) (3) и (XXVI) (4) в трифторэтаноле (а) и воде (б)

обратимо: эффект исчезает после отмывания кожи в растворе Рингера. Эффект удлинения действия пептидов может быть определен путем фиксирования скорости осветления кожи лягушки при последовательном отмывании после достижения примерно одинаковой степени потемнения под действием изучаемых соединений. Разница в скорости осветления кожи, т. е. удлинение действия гормонов, может быть связана с разным сродством циклопептидов к клеточным рецепторам. Соединение с большим сродством к рецептору, очевидно, должно иметь более выраженный и стабильный эффект. Исследования показали, что соединение (III) проявляет более длительное действие, чем АСТН-(1-24)-тетракозапептид, в то время как циклопептид (XXVI) отмывается значительно быстрее последнего (рис. 3).

Таким образом, на основании изучения стероидогенной активности синтезированных соединений и результатов по удлинению меланоцитостимулирующего действия можно заключить, что структура соединения (III) более согласуется с требованиями клеточных рецепторов и увеличение размера цикла в ряду циклоаналогов фрагмента (5-14) при переходе от соединения (III) к соединению (XXVI) в отличие от аналогов фрагмента (5-10) приводит к некоторому изменению пространственной структуры соединений.

Конформационное состояние АСТН и его фрагментов неоднократно изучалось методом КД-спектроскопии [7-12]. Было найдено, что АСТН и его N-концевые фрагменты в воде принимают структуру «неупорядоченного клубка», а в трифторэтаноле —  $\alpha$ -спиральную конформацию [8]. В более поздних работах было выдвинуто предположение, что даже в воде АСТН и его N-концевые фрагменты имеют элементы пространственной организации — наиболее вероятно,  $\alpha$ -спирали [10]. Найдено, что в кри-

таллическом состоянии фрагменту (4—10) свойственна антипараллельная  $\beta$ -структура [13] в отличие от фрагмента (4—7), имеющего конформацию  $\beta$ -изгиба.

Нами были изучены спектры КД циклоаналогов (I—III, XXVI) и их линейных предшественников в воде и трифторэтаноле. Найдено, что все соединения в водных растворах имеют спектры КД, характерные для конформации «неупорядоченного клубка» (рис. 4б и 5б). В их спектрах наблюдается отрицательная полоса в области 190—200 нм и слабая положительная полоса в районе 220 нм. Столь упрощенной интерпретации противоречит тот факт, что спектры циклических аналогов практически не отличаются от спектров их линейных предшественников (рис. 4б, 1, 2; рис. 5б, 1, 2). Можно предположить, что пептидный остов фрагмента (5—10) имеет изгиб, а циклизация лишь фиксирует этот изгиб. Это является дополнительным доводом в пользу высказанной ранее в литературе [10] мысли о том, что АСТН и его фрагменты имеют элементы упорядоченной структуры даже в водных растворах.

В трифторэтаноле — растворителе, способствующем образованию упорядоченных структур у пептидов и белков, вид спектра КД циклических аналогов существенно не меняется (рис. 4а, б, 2, 4; рис. 5а, б). Влияние трифторэтанола сказывается, очевидно, только на окружении ароматических хромофоров, имеющих значительный удельный вес в этих пептидах. Происходит изменение в значениях дихроичного поглощения при 220—225 нм, обусловленного в основном  $^1L_a$ -переходом этих хромофоров (рис. 4а, б). Спектры КД в трифторэтаноле циклоаналога (III) и его линейного предшественника, декапептида (5—14) (IIIа), различаются. Декапептид (5—14) имеет спектр КД с двумя отрицательными полосами дихроичного поглощения при 202 и 225 нм (рис. 5а, 1), характерными для спектра КД  $\alpha$ -спирали белков.

Таким образом, близость характеристик спектров КД циклических пептидов и их линейных предшественников в воде и трифторэтаноле свидетельствует о близости и сравнительной жесткости структур циклических и линейных соединений, т. е. данные КД-спектроскопии косвенно указывают на то, что циклизацией фиксирована оптимальная или близкая к ней конформация линейного пептида. Следовательно, оптимальная конформация активного центра характеризуется петлеобразным изгибом пептидного остова в районе АСТН-(5—10)\*.

Из сопоставления меланоцитостимулирующей активности синтезированных нами соединений видно, что активность обусловлена фрагментом (5—10), который должен соответствовать определенным структурным требованиям рецептора, т. е. иметь определенную конформацию. Циклообразование на базе фрагмента (5—10) не нарушает этого соответствия рецептору, даже как бы фиксирует его, следствием чего является повышение активности циклоаналога (I) до уровня активности линейного фрагмента АСТН-(5—14).

Можно предположить, что второй активный центр — общий фрагмент (11—14), входящий в состав АСТН-(5—14), выступает в качестве структурообразующего элемента и обеспечивает реализацию петлеобразной структуры активного фрагмента (5—10), которая в циклоаналоге (I) зафиксирована ковалентной связью.

Действительно, фиксирование циклической структуры во фрагменте (5—14) повышает меланоцитостимулирующую активность на 3 порядка (даже при исключении положительного заряда в боковой цепи остатка лизина в общем фрагменте).

Таким образом, полученные данные говорят в пользу гипотезы о структурообразующей функции общего фрагмента (11—14) для поддержания активного фрагмента (5—10) в соответствующей рецептору петлеобразной конформации.

\* Аналогичный вывод следует также из работ В. Хруби и соавт. по синтезу и меланоцитостимулирующей активности циклоаналогов  $\alpha$ -меланотропина и его фрагментов, циклическая структура которых фиксирована дисульфидной связью между остатками цистеина в положениях 4 и 10 [14, 15].

## Экспериментальная часть

Для синтеза использованы производные *L*-аминокислот, поставляемые фирмой Reanal (Венгрия). Упаривание растворов проводили на вакуумном испарителе при 40°С. Температуры плавления, определенные в открытых капиллярах, даны без исправления. Индивидуальность полученных соединений проверяли с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем Merck 60F<sub>254</sub> (ФРГ). Приведены хроматографические подвижности ( $R_f$ ) в системах: этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 5:3:1:2 (А), хлороформ — этанол — *n*-бутанол — этилацетат — вода, 10:6:4:3:1 (Б), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 85:10:5 (В), хлороформ — этанол — уксусная кислота — вода, 120:41:6:6 (Г), *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 4:1:1:2 (Д), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:5, верхняя фаза (Е).

Электрофоретическую подвижность по отношению к гистидину ( $E_{\text{HIS}}$ ) определяли на бумаге FN-15 (ГДР) в 5 н. уксусной кислоте (рН 1,9) при потенциальном градиенте 18 В/см, вещества обнаруживали в УФ-свете, а также с помощью нингидрина, реагентов Эрлиха, Сакагучи, Бартона, Паули и Рейнедья-Хоппе.

Удельное вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer 144 (США). Элементный анализ (С, Н, N) соединений удовлетворительно совпал с теоретическим.

Структуру соединения (XXVI) подтверждали данными <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии. Спектры регистрировали на приборе Bruker WM-360 (ФРГ) с рабочей частотой 360 МГц; в качестве внутреннего стандарта использовали Na-соль 3-(триметилсилил)пропансульфонокислоты. Спектры снимали в воде при 30°С, концентрация соединения (XXVI) составляла 0,032 М. Отнесение сигналов проводили методом двойного резонанса. Сигнал при δ 3,39 м.д. соответствует амидному протону глицина, присоединенного к ε-NH<sub>2</sub>-группе остатка лизина.

Отнесение резонансных сигналов некоторых аминокислотных остатков соединения (XXVI) проведено с помощью двумерной корреляционной спектроскопии (COSY). COSY-спектры получены с помощью импульсной последовательности (90° —  $t_1$  — 90° —  $t_2$ ) для 512 значений  $t_1$  в диапазоне 0,1—51,2 мс. Число накоплений  $n$  128, задержка между последовательностями импульсов 1,5 с. Сигнал растворителя (H<sub>2</sub>O) насыщали селективным импульсом в течение всего эксперимента, за исключением времени наблюдения. Данные обрабатывали на ЭВМ Aspect 2000.

Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (δ, м.д.): 8,39 (NH, N<sup>ε11</sup>-Gly); 8,01 (NH, Arg); 8,24 (NH, Gly<sup>10</sup>); 7,62 (NH, Lys<sup>11</sup>); 8,17 (NH, Val); 7,96 (NH, Gly<sup>14</sup>); 7,94 (N<sup>εH</sup>); 3,85 (C<sup>α</sup>H; N<sup>ε11</sup>-Gly); 4,17 (C<sup>α</sup>H, Arg); 3,54; 3,81 (C<sup>α</sup>H, Gly<sup>10</sup>); 4,35 (C<sup>α</sup>H, Lys<sup>11</sup>); 4,02 (C<sup>α</sup>H, Val); 3,80 (C<sup>α</sup>H, Gly<sup>14</sup>).

Спектры КД записывали на дихрографе Jobin — Ivon Mark III (Франция). Дихрограф калибровали по стандартам 10-камфорсульфоновой кислоты и эпиандростерона. Для записи спектров использовали кюветы из плавленного кварца фирмы Hellma с длиной оптического пути 1 см в спектральном диапазоне 300—250 нм и 0,1—0,01 см в области 250—180 нм. Концентрация растворов 10<sup>-3</sup>—10<sup>-4</sup> М. Целевая программа соответствовала 20 Å. Полученные спектры обрабатывали на ЭВМ Wang 2200 VP (США) с устройством ввода графической информации с помощью специально разработанного пакета программ. Молекулярную эллиптичность [θ] измеряли в град·см<sup>2</sup>/дмоль.

Жидкостную хроматографию пептидов проводили на хроматографе Jobin — Ivon Chromatospak Prep 10 (Франция), на колонках Li Chromrep TM Si60, Lobar, Merck (ФРГ) и на хроматографе Du Pont 830 (США), используя колонки Zorbax C<sub>8</sub>. Конечные продукты лиофилизовали.

Соединения (II) — (III) получали как описано в сообщении [3], соединения (XIII) — (XXII) — как описано в сообщении [2].

Стероидогенную активность соединений *in vitro* определяли согласно работе [6]. Активность соединений вычисляли в процентах от максимального эффекта АСТН-(1—24)-тетракозапептида, достигаемого при концен-

трации  $10^{-9}$  М и принятого за 100% ( $\pm 5,0\%$ ). Для сравнения стероидогенной активности соединений рассчитывали их молярные активности (МА) — отношение  $EC_{50}$  стандарта к  $EC_{50}$  исследуемого вещества, где  $EC_{50}$  — концентрация пептида, при которой достигается половина от максимального эффекта. В качестве стандарта выбран АСТН-(1-24)-тетракозапептид.

*Меланоцитостимулирующую активность* соединений *in vitro* определяли согласно [2]. Длительность меланоцитостимулирующего эффекта пептидов *in vitro* на изолированной коже лягушки определяли по скорости отмывания кожи в растворе Рингера после предварительной обработки изучаемыми пептидами. Использовали концентрации соединений, вызывающие приблизительно равный ответ: АСТН-(1-24)-тетракозапептид —  $10^{-6}$  М; соединение (III) —  $2 \cdot 10^{-7}$  М; соединение (XXVI) —  $10^{-7}$  М. После 45 мин инкубации в растворах пептидов кожи промывали раствором Рингера [2], не содержащим пептидов. Промывание повторяли каждые 20 мин и после каждого промывания измеряли отражение кожи. Обработка результатов проведена согласно [2]. Для сравнения меланоцитостимулирующей активности пептидов определены концентрации, при которых соединения вызывают одинаковый уровень потемнения кожи. Так как максимальная степень потемнения кожи под действием АСТН-(1-24)-тетракозапептида составляет 50–30%, то для сравнения пептидов выбрана концентрация, вызывающая потемнение кожи на 30%, —  $c_{30}$ .

*HCl-Z-Lys-Pro-Val-Gly-NH<sub>2</sub> (X)*. 2,5 г (3,95 ммоль) соединения (IX) растворяли в 15 мл уксусной кислоты и добавляли 50 мл 3 М раствора HCl в уксусной кислоте. Оставляли на 20 мин, упаривали, растирали с эфиром. Сушили в вакуумном эксикаторе над КОН. Выход 2,2 г (98%). Т. пл. 75° С (разл.);  $[\alpha]_D^{25}$   $-35,3^\circ$  ( $c$  1, DMF);  $R_f$  0,34 (A);  $E_{HIS}$  0,55 (pH 1,9).

*Z-Lys(Boc-Gly)-Pro-Val-Gly-NH<sub>2</sub> (XI)*. К раствору 2 г (3,5 ммоль) соединения (X) в 15 мл DMF добавляли 0,6 мл (3,5 ммоль) N,N-диизопропиламина и 1,05 г (3,85 ммоль) Boc-Gly-ONSu. Перемешивали 16 ч при 20° С. К реакционной смеси добавляли 0,2 мл N,N-диметиламиноэтиламина. Перемешивали 1 ч и выливали в 50 мл воды, которую подкисляли 10%  $KHSO_4$  до pH 5. Экстрагировали 50 мл этилацетата, органический слой промывали 10%  $KHSO_4$  (3×20 мл), водой, частично упаривали, прибавляли 20 мл смеси этанол — бензол (4:1) и упаривали вновь. Остаток растирали с эфиром. Выход 1,5 г (62%). Т. пл. 100–140° С,  $[\alpha]_D^{25}$   $-32,5^\circ$  ( $c$  1, DMF);  $R_f$  0,82 (A); 0,75 (B).

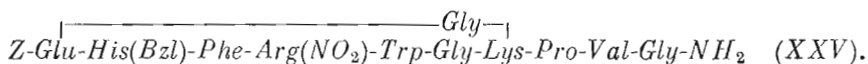
*H-Lys(Boc-Gly)-Pro-Val-Gly-NH<sub>2</sub> (XII)*. 3,75 г (5,4 ммоль) соединения (XI) растворяли в 30 мл смеси метанол — вода (4:1) и гидрировали в токе водорода над Pd-чернью 3 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Продукт растирали с эфиром. Выход 2,95 г (98%). Т. пл. 70° С (разл.);  $[\alpha]_D^{25}$   $-24^\circ$  ( $c$  1, DMF);  $R_f$  0,3 (C);  $E_{HIS}$  0,51.

*Z-Glu(OBu')-His(Bzl)-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Trp-Gly-Lys(Boc-Gly)-Pro-Val-Gly-NH<sub>2</sub> (XXIII)*. 1,89 г (1,6 ммоль) соединения (XXII) растворяли в 15 мл DMF и добавляли 0,43 г (3,2 ммоль) НОВТ. Охлаждали до 0° С, добавляли 0,23 г (1,76 ммоль) DCC и раствор 0,89 г (1,6 ммоль) соединения (XII) в 10 мл DMF. Перемешивали 3 ч при 0° С и оставляли на 16 ч при 20° С. Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали. К остатку добавляли 10 мл DMF, выпавший осадок отфильтровывали и фильтрат выливали в 50 мл 10%  $KHSO_4$ . Выпавший продукт отфильтровывали, на фильтре промывали 10%  $KHSO_4$ , водой, 5%  $NaHCO_3$  и снова водой. Продукт при нагревании растворяли в 30 мл этанола, осаждали эфиром. Осадок отфильтровывали и растворяли в 5 мл хроматографической системы В. Наносили на колонку с силикагелем (Lobar, Size B 310-25) и элюировали системой В. Фракции элюата, содержащие чистый ундекапептид (XXIII), объединяли, упаривали, остаток растирали с эфиром. Выход 1,03 г (37%). Т. пл. 117° С (разл.);  $[\alpha]_D^{25}$   $-30^\circ$  ( $c$  1, DMF);  $R_f$  0,81 (D), 0,37 (B).

*2HCl-Z-Glu-His(Bzl)-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Trp-Gly-Lys(Gly)-Pro-Val-Gly-NH<sub>2</sub> (XXIV)*. Растворяли 0,4 г (0,2 ммоль) соединения (XXIII) в 10 мл муравьиной кислоты. К раствору добавляли 0,3 г дитиотреита, 2 мл тиоанизола и 20 мл 0,88 М раствора HCl в муравьиной кислоте. Выдерживали



45 мин при 20° С. Упаривали, к остатку добавляли метанол и упаривали вновь досуха. Продукт растирали смесью этанол — эфир и высушивали в вакууме над КОН. Очищали ВЭЖХ (сорбент — силикагель Н60 фирмы Мерск; элюент — система Г). Выход 0,18 г (50%). Т. пл. 71° С (разл.);  $[\alpha]_D^{25}$  -29° (с 1, DMF);  $R_f$  0,7 (Д);  $E_{\text{HIS}}$  0,58.



Раствор 0,4 г (0,24 ммоль) соединения (XXIV) в 31 мл DMF охлаждали до 0° С и добавляли 0,08 мл (0,48 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина. Реакционную смесь охлаждали до -25° С и добавляли 0,07 мл дифенилфосфорилазида. Раствор выдерживали 48 ч при -25° С, 48 ч при 2° С и 72 ч при 20° С. Упаривали растворитель, к остатку добавляли 50 мл 10% KHSO<sub>4</sub> и экстрагировали 50 мл *n*-бутанола. Органический слой промывали 10% KHSO<sub>4</sub> (3×25 мл), водой, 5% NaHCO<sub>3</sub> (3×25 мл) и снова водой. Упаривали органический растворитель, к остатку добавляли 40 мл смеси этанол — бензол (4 : 1) и упаривали вновь. Продукт при нагревании растворяли в 20 мл этанола и осаждали эфиром. Осадок отфильтровывали и растворяли в 10 мл хроматографической системы Б. Наносили на колонку с силикагелем (Lobar, Size В 310-25) и элюировали системой Б. Фракции элюата, содержащие чистый пептид (XXV), объединяли и упаривали. Остаток растирали с эфиром. Выход 0,13 г (34%). Т. пл. 143° С (разл.);  $[\alpha]_D^{25}$  -24° (с 0,4, DMF);  $R_f$  0,41 (Б); 0,34 (Е).

[*cyclo*(Gly<sup>1</sup>→<sup>\*</sup>Lys(Gly))]ACTH-(5-14)-ундеканептид (XXVI). 0,13 г (0,08 ммоль) пептида (XXV) растворяли в 5 л смеси метанол — вода (4 : 1) и гидрировали над Pd-чернью 4 сут. Катализатор отфильтровывали. К раствору добавляли 1 мл уксусной кислоты, новую порцию катализатора и гидрировали над Pd-чернью 2 сут. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали. Остаток растворяли в 1 мл этанола и осаждали эфиром. Очищали хроматографией на колонке Zorbax C<sub>8</sub> (0,46×25 см) в системе 18% CH<sub>3</sub>CN — 82% 0,2 М AcONH<sub>4</sub>. Выход 0,004 г (38%).  $R_f$  0,34 (Д);  $E_{\text{HIS}}$  0,82.

*H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(Gly)-Pro-Val-Gly-NH}\_2* (XXVIa) получали гидрогеполлизом соединения (XXIV) аналогично получению соединения (XXVI). Очищали хроматографией на колонке Zorbax C<sub>8</sub> (0,21×25 см) в системе 20% CH<sub>3</sub>CN — 80% 0,2 М AcONH<sub>4</sub>. Выход 40%.  $R_f$  0,24 (Д);  $E_{\text{HIS}}$  0,99.

Авторы благодарны И. П. Секацису за съемку спектров <sup>1</sup>H-ЯМР и помощь в их интерпретации и В. Д. Григорьевой за хроматографическую очистку конечных продуктов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Jean-Baptiste E., Draper M. W., Rizak M. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 10, p. 4329-4331.
2. Лиепкаула И. К., Романовский П. Я., Скуиньш А. А., Порункевич Е. А., Раткевич М. П., Чипенс Г. И. Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 6, с. 807-816.
3. Лиепкаула И. К., Романовский П. Я., Скуиньш А. А., Порункевич Е. А., Раткевич М. П., Чипенс Г. И. Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 10, с. 1326-1332.
4. Романовский П. Я., Хенклейн П., Бендерс Ю. А., Сысков И. В., Чипенс Г. И. В кн.: Всес. симпоз. по химии и физике белков и пептидов. Тез. докл. Баку, 1980, с. 229.
5. Brady S. F., Varga S. L., Freidinger R. H., Schwenk D. A., Mendlowski M., Holly F. W., Veber D. F. J. Org. Chem., 1979, v. 44, № 18, p. 3101-3105.
6. Скуиньш А. А., Раткевич М. П., Кублис Г. Г., Порункевич Е. А., Сысков И. В., Чипенс Г. И. Биохимия, 1982, т. 47, с. 1108-1112.
7. Holladay L. A., Puett D. Biopolymers, 1976, v. 15, p. 43-59.
8. Graff D., Toma F., Femandjian S., Löw M., Kisfaludy L. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 439, p. 219-231.
9. Toma F., Dive V., Lam-Thanh H., Piriou F., Lintner K., Femandjian S., Löw M., Kisfaludy L. Biochimie, 1981, v. 63, p. 907-910.
10. Löw M., Kisfaludy L., Hajos Gy., Szporny L., Makara G. B., Toma F., Femandjian S. Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung., 1981, v. 16, p. 105-108.
11. Сысков И. В., Катаев Б. С., Раткевич М. П., Скуиньш А. А., Романовский П. Я.,

Порункевич Е. А., Чипенс Г. И. Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1982, № 6, с. 728–731.

12. Сысков И. В., Романовский П. Я., Восекална И. А., Скуиньш А. А., Раткевич М. П., Катаев В. С., Порункевич Е. А., Чипенс Г. И. Биоорганическая химия, 1984, т. 10, № 5, с. 618–625.
13. Admiraal G., Vos A. Int. J. Peptide and Protein Res., 1984, v. 23, p. 151–157.
14. Sawyer T. K., Varman P. S., Hruby V. J., Hadley M. E. In: Peptides, chemistry, structure and function. Proc. 7th Amer. Peptide Symp./Eds Rich D. H., Gross E. Rockford: Pierce Chem. Company, 1981, p. 387–390.
15. Hruby V. J., Mosberg H. J., Sawyer T. K., Knittel J. J., Rockway T. W., Ormberg J., Darmon P. Biopolymers, 1983, v. 22, p. 522–530.

Поступила в редакцию  
3.I.1985

После доработки  
22.III.1985

**SYNTHESIS OF [*cyclo*(Glu<sup>γ</sup>—<sup>ε</sup>Lys(Gly))]ACTH-(5–14)-UNDECAPEPTIDE.  
BIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ACTH-(5–10)- AND  
ACTH-(5–14)-PEPTIDES**

LIEPKAULA I. K., SKUJINS A. A., ROMANOVSKIS P. J. \*, PORUNKEVICH E. A.,  
RATKEVICH M. P., VOSEKALNA I. A., GAILITE E. A., CHIPENS G. I.

*Institute of Organic Synthesis and \*Experimental Plant of IOS,  
Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga*

Modified corticotropin fragment — [Lys<sup>11</sup>(Gly)]ACTH-(5–14)- and its cyclic analogue — [*cyclo*(Glu<sup>γ</sup>→<sup>ε</sup>Lys(Gly))]ACTH-(5–14)-undecapeptides have been synthesized by classical approach. The cyclic structure has been fixed by amide bond between γ-COOH group of glutamic acid and α-NH<sub>2</sub> group of glycine coupled to the ε-NH<sub>2</sub> group of lysine. Fragment condensation has been achieved by azide or dicyclohexylcarbodiimide methods. Cyclization has been performed using diphenylphosphorylazide. The melanotropic activity of the cyclic analogue on isolated frog skin exceeds by two orders of magnitude that of the linear undecapeptide, however the steroidogenic activity in isolated cells of rat adrenal cortex is diminished by an order of magnitude as compared with that of the linear precursor. A similarity of the CD spectra for the cyclic ACTH peptides and their linear counterparts in water and trifluoroethanol points to the similarity and relative rigidity of their structures.