

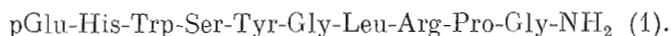


УДК 547.466.1.057+615.357.011.5+612.826.4.018

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЮЛИБЕРИНА
И ЕГО АНАЛОГОВ*Баев В. В.*, Мирошников А. И.*, Бакалкин Г. Я.,
Комиссарова Е. Н., Исаченков В. А.*** Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва;**Центральная научно-исследовательская лаборатория
4-го Главного управления при Министерстве здравоохранения СССР, Москва*

Предложен удобный метод синтеза люлиберина и его аналогов исходя из бензгидриламида глицина. Этим методом синтезированы люлиберин, Leu^{2,3}-люлиберин и С-концевой гексапептид. Модификацией ароматических аминокислотных остатков гормона получено четыре новых аналога. Кроме того, твердофазным методом пептидного синтеза получены люлиберин и его дез-His²- и D-Phe²-аналоги. Изучены биологические и иммунохимические свойства синтезированных соединений. Показана важность остатков ароматических аминокислот, особенно гистидина, для проявления биологической активности, включая антагонистические свойства аналогов, модифицированных по 2-му положению.

Строение гипоталамического релизинг-гормона люлиберина (1) (LH-RH/FSH-RH или LRF [1]), стимулирующего освобождение гипофизарных гормонов лютропина и фоллитропина, было установлено в 1971 г. Шелли [2] и Гильменом [3]:



Вслед за этим были осуществлены синтезы этого релизинг-гормона твердофазным методом [4—11] и методами классической пептидной химии [11—17].

С целью изучения физико-химических и биологических свойств люлиберина, установления взаимосвязи между строением и биологической активностью, а также поиска удобных методов синтеза проведены синтезы декапептида (1) и ряда его аналогов с использованием твердофазной и классической методик пептидного синтеза. Кроме того, для выявления важности аминокислотных остатков в молекуле были проведены химические модификации гормона по остаткам гистидина, тирозина и триптофана [18].

Ряд исследователей полагает, что «активный участок» молекулы люлиберина локализован в N-концевой части пептида [19], включая остаток гистидина. Учитывая имеющиеся в литературе данные об антагонистической активности Leu^{2,3}-LRF (2), дез-His²-LRF (3) и D-Phe²-LRF (4) [20—22], представлялось интересным синтезировать эти аналоги и сравнить их физико-химические и биологические свойства. Для выяснения роли остатков ароматических аминокислот в биологической и иммунохимической активности гормона получен гексапептид Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

Синтезированные соединения

№	Соединение	Метод синтеза *	Обозначение	$[\alpha]_D^{25}$, град (1% HOAc)
1	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	ТФ, КЛ	LRF	-50,4
2	pGlu-Leu-Leu-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	КЛ	Leu ^{2,2} -LRF	-51,2
3	pGlu-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	ТФ	His ² -LRF	-47,2
4	pGlu-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	ТФ	D-Phe ² -LRF	-42,0
5	Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	КЛ	—	-36,8
6	pGlu-His(EtOCO) ² -Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	XM	(EtOCO) ² His ² -LRF	-38,6
7	pGlu-His-Trp(Nps)-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	XM	Nps-LRF	-28,8
8	pGlu-His-Trp(Form)-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	XM	N ¹⁴ -Form-LRF	-46,7
9	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr(NO ₂)Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	XM	NO ₂ -Tyr ⁵ -LRF	-35,7

* ТФ — твердофазный, КЛ — классический, XM — химическая модификация липоферина.

№	Промежуточные защищенные пептиды	Выход, %	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, град (DMF)
17	Leu-Arg(NO ₂)-Pro-Gly-NHBzh-TFA	71	128-130	-28,2
19	Вос-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(NO ₂)-Pro-Gly-NHBzh	79	120-121	-37,6
22	Z-pGlu-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr-(Bzl)-Gly-Leu-Arg(NO ₂)-Pro-Gly-NHBzh	84	134-135	-28,8
29	Z-pGlu-Leu-Leu-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-OH	46	174-175	-35,7
30	Z-pGlu-Leu-Leu-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(NO ₂)-Pro-Gly-NHBzh	71	170-172	-42,6
31	I oc-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(NO ₂)-Pro-Gly-NHBzh	76	125-126	-37,7
32	Z-pGlu-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH ₂	42	131-132	-28,7
33	Z-pGlu-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH ₂	45	122-123	-41,4
34	Z-pGlu-D-Phe-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH ₂	43	135-136	-38,6

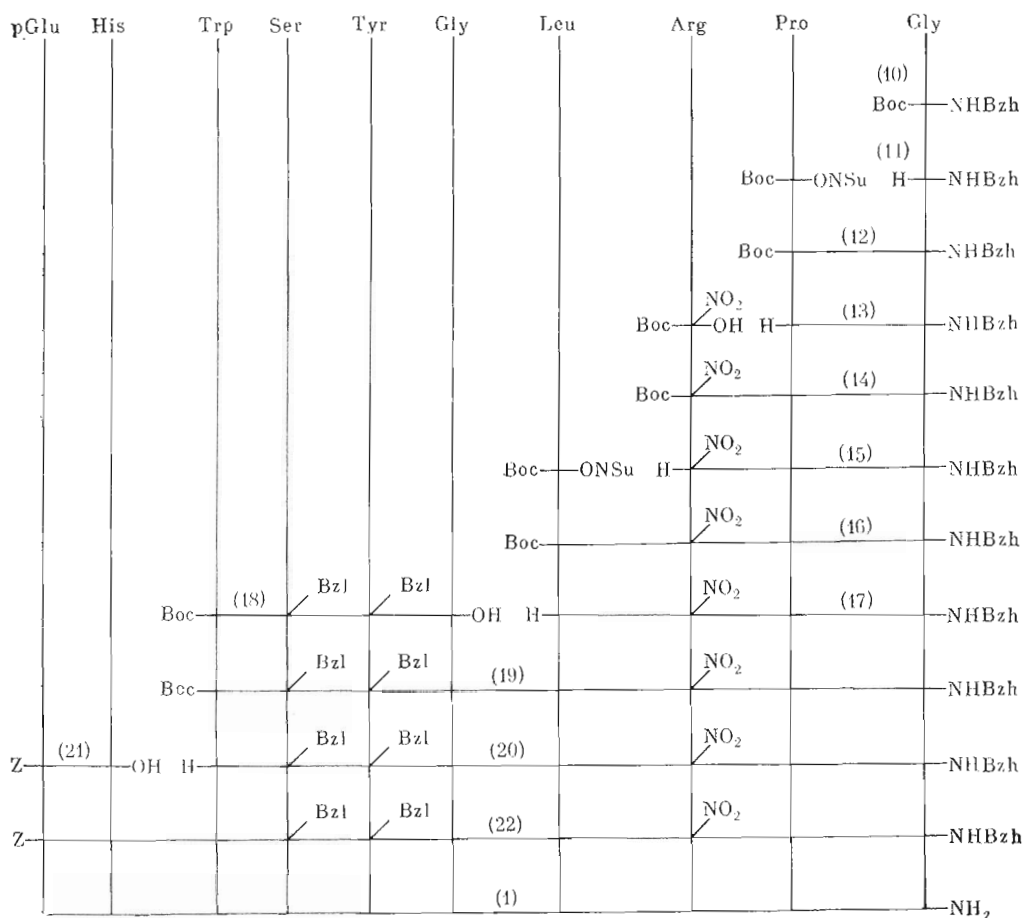


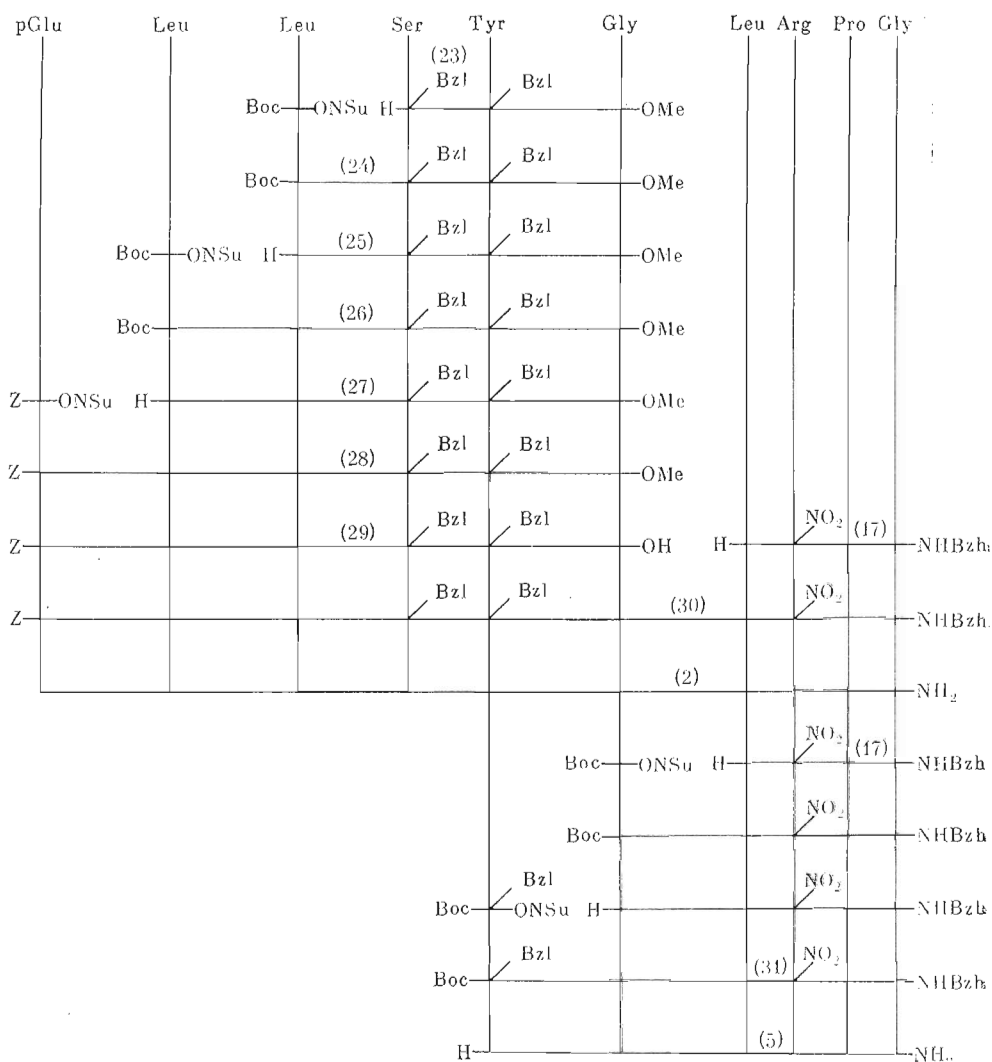
Схема 1. Синтез люлиберина (1)

(5), включающий лишь один остаток ароматической аминокислоты, а также проведены химические модификации остатков: гистидина — этоксикарбонилированием, триптофана — нитрофенилсульфенированием и формилированием, тирозина — нитрованием [18]. Синтезированные соединения представлены в табл. 1.

Для синтеза пептидов использовали *N*-*tert*-бутилоксикарбонил-*L*-аминокислоты (Boc-AA). Для блокирования функциональных групп в боковых цепях аминокислотных остатков применяли: бензильную защиту (Bzl) для серина и тирозина, тозилльную (Tos) защиту для аргинина и гистидина и в случае классического синтеза — нитрогруппу (NO₂) для аргинина. Пироглутаминовую кислоту вводили в виде *N*-бензилоксикарбонильного производного (Z-pGlu).

На схемах 1—2 показаны пути синтеза люлиберина (1) и его аналогов (2), (5), синтезированных методами классической пептидной химии: карбодимидным (DCC), активированных эфиров и смешанных ангидридов. В целях повышения растворимости и облегчения очистки на каждой стадии пептидного синтеза амидная функция C-концевого остатка глицина (Gly¹⁰) блокировалась бензильной (Bzh) группой. Промежуточные защищенные пептиды (17), (18), (20), (24), (29) конденсировали карбодимидным методом с добавлением 1-оксибензотриазола (HOBT).

Твердофазный синтез проводили в автоматическом пептидном синтезаторе «Beckman 990» на хлорметилированном полимерном носителе с использованием DCC [23]. Boc-группы отщепляли 25% раствором трифторук-



С х е м а 2. Синтез аналогов люлиберина (2), (5)

сусной кислоты (TFA) в хлористом метиле; после присоединения к пептид-полимеру остатка триптофана деблокирование аминокрупп проводили с добавлением 2-меркаптоэтанола. Амиды защищенных пептидов (32)—(34) (см. табл. 2) получали аммолизом соответствующих пептид-полимеров в этаноле.

Полное удаление защитных групп проводили обработкой соединений (22), (30)—(34) безводным фтористым водородом с добавлением анизола и триптофана при 0° в приборе Сакакибара [23, 24].

Химическую модификацию остатка гистидина осуществляли обработкой раствора люлиберина диэтоксипирокарбонатом (C₂H₅OCO)₂O при pH 6 [25]; нитрование остатка тирозина проводили тетранитрометаном в водно-спиртовом растворе [26]. Остаток триптофана модифицировали Nⁱⁿ-формилированием (HCl/HCOOH) [27] и *o*-нитрофенилсульфенированием (NpsCl/CH₃COOH) [28].

Конечные пептиды подвергались гель-филтрации на сефадексе G-25F и ионообменной хроматографии на CM-целлюлозе. Чистота промежуточных соединений и конечных продуктов контролировалась тонкослойной

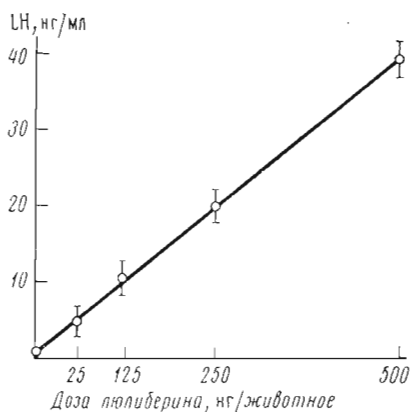


Рис. 1

Рис. 1. Изменение концентрации лютропина (ЛН) в сыворотке крыс после введения различных доз люлиберина

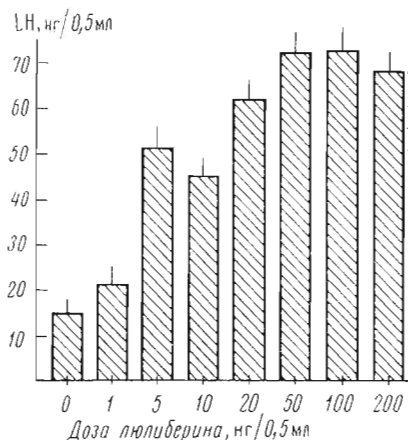


Рис. 2

Рис. 2. Влияние люлиберина на секрецию лютропина гипофизами крыс *in vitro*

хроматографией (ТСХ), электрофорезом, элементным и аминокислотным анализами.

Определены биологические и иммунохимические свойства синтезированных соединений (табл. 3).

Биологическую активность пептидов оценивали по их способности освобождать лютропин (ЛН) из гипофизов крыс *in vivo*, используя методы радиоиммунохимического анализа лютропина [29]. Как следует из рис. 1, при введении животным люлиберина наблюдалась линейная зависимость между количеством введенного гормона и концентрацией лютропина в сыворотке, что позволяет оценить биологическую активность аналогов люлиберина, сравнивая ее с активностью синтетического гормона. Биологическую активность аналогов выражали в процентах от активности синтетического люлиберина (см. табл. 3). Иммунохимические свойства синтезированных соединений определены при помощи радиоиммунохимического метода определения люлиберина [30]. Кроме того, была получена информация, касающаяся антагонистических свойств некоторых аналогов люлиберина, т. е. их способности влиять на освобождение лютропина из гипофизов крыс *in vitro*, стимулированное люлиберинем. На рис. 2 приведены данные, свидетельствующие о стимуляции люлиберинем секреции лютропина при инкубации гипофизов крыс *in vitro*. Аналоги (2)–(4) ингибируют этот процесс и не обладают при этом агонистической активностью (см. табл. 4), т. е. практически не влияют на секрецию лютропина *in vitro*. Для определения антагонистической активности аналогов исполь-

Таблица 3

Биологические и иммунохимические свойства синтезированных соединений

Активность	Пептиды								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Иммунохимическая, %	100	-	--	—	12	1,1	10	22	2
Биологическая, %	100	<0,01	<0,01	<0,01	<0,2	<0,2	<0,2	1,35	<0,2
Антагонистическая, мкг	—	100	8	9,8	—	—	—	—	—
10 нг люлиберина									

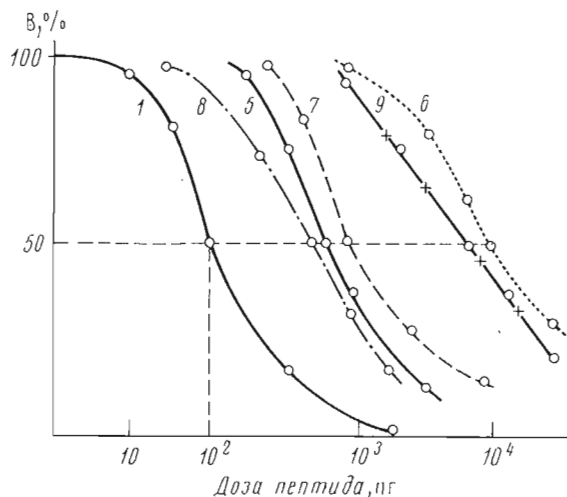


Рис. 3. Взаимодействие с антисывороткой к люлиберину синтезированных соединений (1), (5) — (9). В — связанный антисывороткой [125 I]люлиберин (% от максимально связанного)

зовали следующий параметр: количество аналога (в мкг), необходимое для двукратного уменьшения скорости секреции лютропина, стимулируемой 10 нг люлиберина.

Как следует из табл. 3, при всех способах химической модификации молекулы гормона биологическая активность резко снижается. В меньшей степени снижается иммунохимическая активность (рис. 3). Среди модифицированных аналогов наибольшей активностью обладает N^{in} -Form-LRF (8), проявляющий также и максимальную биологическую активность. Это объясняется, по-видимому, малыми размерами формильной группы и незначительными изменениями электронной плотности в индольном кольце остатка триптофана при ацилировании атома азота. Напротив, биологическая и иммунохимическая активности 2-тионитрофенильного производного (7) и 3-нитротирозинового производного (9) невелики, что может быть обусловлено влиянием электроноакцепторных Np - и NO_2 -групп, связанных с ароматическими атомами углерода.

Таблица 4

Антагонистическая активность аналогов люлиберина

№ аналога	Доза люлиберина, нг/0,5 мл	Доза аналога, мкг/0,5 мл	Концентрация лютропина, нг/0,5 мл инкубационной среды	P
—	0	0	$15,5 \pm 1,23$	$< 0,001$
—	10	0	$52,3 \pm 3,26$ *	—
2	10	100	$34,0 \pm 0,61$	$< 0,001$
3	10	5	$29,0 \pm 3,48$	$< 0,001$
3	10	20	$33,0 \pm 3,79$	$< 0,01$
3	10	80	$14,0 \pm 1,05$	$< 0,001$
3	0	80	$12,5 \pm 0,81$	$< 0,001$
4	10	5	$41,0 \pm 4,0$	$< 0,05$
4	10	20	$29,5 \pm 3,54$	$< 0,001$
4	10	80	$18,6 \pm 1,71$	$< 0,001$
4	0	80	$12,0 \pm 1,05$	$< 0,001$

* Контроль.

Известно, что в случае удаления или замены гистидина во 2-м положении молекулы (1) на любой другой остаток биологическая активность аналогов резко снижается [12, 22, 31]. Это подтверждается также химической модификацией люлиберина: этоксикарбонилирование остатка гистидина приводит к потере биологической и иммунохимической активности $(EtOCO)_2His^2-LRF$ (6) (табл. 3). Аналоги дез- His^2-LRF (3), $Leu^{2,3}-LRF$ (2) и $D-Phe^2-LRF$ (4) также оказались неактивными, однако они обладают при этом значительными антагонистическими свойствами, т. е. препятствуют освобождению лютропина из гипофиза, стимулируемому люлиберинном. Максимальный антагонизм проявляет дез- His^2-LRF (3) (табл. 3 и 4). Результаты, полученные при определении антагонистической активности аналогов (2)—(4), находятся в соответствии с литературными данными [21, 22, 32]. Как и предполагалось, гексапептид (5), имея достаточную иммунохимическую активность, не обладает биологической активностью, так как в его молекуле отсутствуют не только такие важные остатки ароматических аминокислот, как гистидин и триптофан, которые, по мнению ряда авторов, ответственны за связывание с рецептором [19, 20, 31], но и N-концевая пироглутаминовая кислота, отсутствие которой приводит, как было показано ранее [31, 33], к утрате биологической активности.

Экспериментальная часть

Все температуры плавления не исправлены. Индивидуальность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем «Silufol» и «Eastman» в системах: $CH_3COOC_2H_5-C_6H_6$, 1 : 1 (А); $C_6H_6-CH_3OH-CH_3COOH$, 7 : 2 : 1 (Б); $C_2H_5OH-H_2O$, 7 : 3 (В), а также электрофорезом на бумаге в вертикальной камере при 900 В в 1 М ацетатном буфере (рН 2,4). Электрофореграммы проявляли нингидрином, реактивом Сакагути и хлор-йодом; пластинки — йодом и нингидрином. Данные элементного и аминокислотного анализов синтезированных соединений соответствовали вычисленным содержанию С, Н, N и соотношениям аминокислот. Удельное вращение определяли при 22—25° на автоматическом цифровом поляриметре Perkin-Elmer 141 (США), длина кюветы 1 дм, c 1,0. Аминокислотный анализ производили на автоматическом анализаторе Durrum D-500 (США). Контроль элюирования при препаративном хроматографическом разделении осуществляли по изменению оптической плотности элюата в проточном абсорбиметре Uvicord II (LKB, Швеция) при 280 нм. Вос-*L*-аминокислоты и прочие реагенты предоставлены фирмами Reanal (ВНР), Fluka (Швейцария) и Protein Research Foundation (Япония).

Растворы веществ в органических растворителях (в этилацетате — предварительно высушенные над Na_2SO_4) упаривали в вакууме на ротационном испарителе при температуре не выше 40°. Выходы и константы основных промежуточных соединений приведены в табл. 2.

Вос-Gly-NHBzh (10). К раствору 35 г (0,2 моль) Вос-Gly в сухом хлороформе добавляли 44 г (0,2 моль) хлоргидрата бензгидриламина и 28 мл (0,2 моль) Et_3N в $CHCl_3$ и при охлаждении смешивали с раствором 41,2 г (0,2 моль) DCC. После 20-часового перемешивания и фильтрации выпавшего осадка растворитель упаривали. Остаток растворяли в этилацетате, промывали водой и этилацетат упаривали. Полученное масло кристаллизовали при затирании с бензолом, бесцветные кристаллы промывали гексаном и сушили в вакууме при 40°. Выход 51 г (77%), т. пл. 115—116°, R_f 0,62 (Б). $C_{20}H_{24}N_2O_3$.

Gly-NHBzh-TFA (II). 34 г (0,1 моль) защищенного глицина (10) растворяли в смеси TFA— $CHCl_3$ (1 : 1), через 20 мин растворители упаривали, остаток заливали эфиром и кристаллизовали при затирании и охлаждении. После фильтрации, промывки эфиром и гексаном и высушивания в вакууме выход 34,6 г (98%), т. пл. 227—228°, R_f 0,32 (Б). $C_{17}H_{17}N_2O_3F_3$.

Woc-Pro-Gly-NHBzh (12). К раствору 25 г (0,08 моль) *Woc-Pro-ONSu* в ДМФА добавляли смесь 28,4 г (0,08 моль) соединения (11) и 12 мл Et_3N в CHCl_3 . После 30-часовой выдержки при комнатной температуре растворители упаривали, остаток распределяли между этилацетатом и водой, органический слой промывали 5%-ными растворами лимонной кислоты, NaHCO_3 , водой и растворитель упаривали. Остаток кристаллизовали из смеси этилацетат — эфир. Выход 28 г (80%), т. пл. 143—144°, R_f 0,32 (A), $[\alpha]_D^{25} -42,4^\circ$ (ДМФА). $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$.

Pro-Gly-NHBzh·TFA (13). Получали аналогично соединению (11) из 28 г защищенного дипептида (12). Выход 27 г (97%), т. пл. 186—188°, R_f 0,41 (B), $[\alpha]_D^{25} -38,6^\circ$ (ДМФА). $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{F}_3$.

Woc-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NHBzh (14). К раствору 19,1 г (0,06 моль) *Woc-Arg(NO₂)* в смеси ДМФА — ТГФ (1 : 2) добавляли 8,5 мл Et_3N и при охлаждении до -8° и перемешивании 8,5 мл изобутилхлорформиата. Через 30 мин добавляли 27 г (0,06 моль) соединения (13) и 9 мл Et_3N в ДМФА. После 5-часового перемешивания при комнатной температуре реакционную смесь обрабатывали аналогично дипептиду (12). Вещество кристаллизовали из этилацетата. Выход 26,7 г (70%), т. пл. 172—173°, R_f 0,35 (A), $[\alpha]_D^{25} -42,5^\circ$ (ДМФА). $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_7$.

Leu-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NHBzh·TFA (17). 9,4 г (0,03 моль) *Woc-Leu-ONSu* добавляли к раствору 19,6 г (0,03 моль) соединения (15) (см. схему 1) и 4,8 мл Et_3N в ДМФА. После выдержки и стандартной обработки аналогично соединению (12) получали белый порошок, который обрабатывали ТФА аналогично веществу (11). Получали белый гигроскопичный порошок. Выход 18,2 г, R_f 0,87 (B), 0,63 (B). $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{N}_9\text{O}_8\text{F}_3$.

Woc-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NHBzh (19). К раствору 8 г (0,01 моль) соединения (18) (см. схему 1) [11] в ТГФ добавляли 7,7 г (0,01 моль) соединения (17) и 1,5 мл Et_3N в ДМФА, охлаждали до 0° и приливали раствор 2,3 г ДСС в ТГФ. После 20-часовой выдержки и обработки полученный порошок промывали эфиром и сушили. Выход 11,4 г, R_f 0,67 (B). $\text{C}_{76}\text{H}_{92}\text{N}_{14}\text{O}_{14}$.

Z-pGlu-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NHBzh (22). К раствору 3 г (0,07 моль) дипептида (21) [34] в ДМФА добавляли 1 г HOEt и при охлаждении 2 г ДСС в ДМФА. Через 1 ч добавляли 10 г соединения (20) в ДМФА, полученного из защищенного октапептида (19) аналогично веществу (11) с добавлением в ТФА 1% 2-меркаптоэтанола, и 1 мл Et_3N . После 20-часовой выдержки и обработки раствора вещества в этилацетате концентрировали и при охлаждении кристаллизовали продукт. После перекристаллизации из этанола выход 10,1 г, R_f 0,8 (B). $\text{C}_{90}\text{H}_{103}\text{N}_{18}\text{O}_{17}$.

Z-pGlu-Leu-Leu-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-OH (29) получали, исходя из 12,7 г (0,02 моль) эфира трипептида (23) [11] (см. схему 2) последовательным наращиванием пептидной цепи, используя *Woc-Leu-ONSu* и *Z-pGlu-ONSu* [34], с последующим омылением метилового эфира (28) 1 н. КОН в метаноле. После подкисления уксусной кислотой и добавления воды выпавший осадок промывали водой и эфиром и сушили. Общий выход 9 г, R_f 0,75 (B). $\text{C}_{53}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_{11}$.

Z-pGlu-Leu-Leu-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NHBzh (30). Получали из 4,8 г (0,005 моль) гексапептида (29) и 3,75 г соединения (17) аналогично веществу (19). Продукт выделяли при добавлении к раствору в ДМФА воды. Выход 5,7 г, R_f 0,63 (B). $\text{C}_{85}\text{H}_{107}\text{N}_{15}\text{O}_{17}$.

Woc-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Gly-NHBzh (31) получали аналогично соединению (28) из *Woc-Gly-ONSu*, *Woc(OBzl)Tyr-ONSu* и 7,65 г (0,01 моль) соединения (17) согласно схеме 2. Общий выход 8,1 г, R_f 0,45 (A). $\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{N}_{11}\text{O}_{11}$.

Woc-Gly-полимер. 16 г хлорметилированного полимерного носителя *Bio-Beads SX-1* (1,29 м·экв Cl/r), 3,5 г *Woc-Gly* и 2,8 мл Et_3N кипятили 24 ч в абс. этаноле. Полимер переносили в реакционный сосуд автомати-

Программа для твердофазного синтеза пептидов (1), (3) и (4)

№ линии	Операция	Используемый реагент	Объем реагента, мл	Время перемешивания, мин
1	Промывка	CH_2Cl_2	3×80	1,5
2	»	25% TFA/ CH_2Cl_2	80	1,5
3	Деблокирование	»	80	30
4	Промывка	CH_2Cl_2	3×80	1,5
5	»	CHCl_3	3×80	1,5
6	Нейтрализация	40% $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$	3×80	1,5
7(15)	Промывка	CHCl_3	3×80	1,5
8(16)	»	CH_2Cl_2	3×80	1,5
9(17)	Дозировка Вос-АА	Вос-АА/ CH_2Cl_2	50	—
10(18)	Перенос Вос-АА	»	50	5
11(19)	Дозировка DCC	1 M DCC/ CH_2Cl_2	20	5
12(20)	Реакция конденсации	—	—	120
13(21)	Промывка	CH_2Cl_2	5×80	1,5
14	»	5% $\text{Et}_3\text{N}/\text{CHCl}_3$	3×80	1,5
22	»	EtOH	3×80	1,5
23	»	CHCl_3	3×80	1,5
24	»	CH_2Cl_2	3×80	1,5
25	Переход к 1-й линии			

ческого пептидного синтезатора Beckman 990 и производили операции 21—24 и 1—8 (см. табл. 5). После высушивания 9,23 мг глицил-полимера гидролизovali в 0,5 мл смеси диоксан — конц. HCl (1 : 1). Аминокислотный анализ показал, что содержание Gly — 0,5 ммоль/г полимера.

Твердофазный синтез пептидов (32)—(34). Для присоединения Вос-АА к глицил-полимеру использовали программу, представленную в табл. 5. Первую Вос-АА — Вос-Рго вводили в реакцию по 5 раз (9—15-я линии) по 20 ммоль (2,5-кратный избыток), остальные Вос-АА по 3 раза, контролируя полноту реакции по нингидриновой пробе [23]. Вос-Arg(Tos), Вос-Leu· H_2O и Z-pGlu растворяли в смеси ДМФА — CH_2Cl_2 (1 : 4). После присоединения Z-pGlu пептидил-полимер извлекали из реактора, суспендировали в абс. этаноле и при -5° насыщали сухим NH_3 . После 20-часовой выдержки при 0° полимер промывали многократно этанолом, CH_2Cl_2 , метанолом и CHCl_3 , фильтраты собирали и упаривали. Полученный белый порошок промывали эфиром и сушили.

Удаление защитных групп и очистка пептидов (1)—(5). Соединения (22), (30)—(34) в количестве 1—2 г, 1 мл анизол и 0,1 г триптофана помещали в реактор прибора Сакакибара и обрабатывали 1—1,5 ч 25—30 мл безводного HF при 0° [24]. После удаления HF полученное вещество растворяли в 50—100 мл 1% раствора НОAc, раствор фильтровали, промывали этилацетатом и лиофилизovali. Полученный сырой продукт наносили на колонку (2,5 × 100 см), заполненную сефадексом G-25F в 0,1 M ацетатном буфере, отбирали Сакагути-положительные фракции, которые затем лиофилизovali и наносили в водном растворе на колонку (2,5 × 10 см), заполненную SM-целлюлозой в воде. Градиентное элюирование проводили при pH 6,0 до 0,1 M NH_4OAc . Содержимое основного пика лиофилизovali дважды.

Аналогичной очистке подвергались пептиды (6)—(9) после химической модификации люлиберина.

Определение иммунохимической активности аналогов люлиберина. Иммунохимическую активность аналогов (C) измеряли с помощью радиоиммунохимического метода определения люлиберина, подробно описанного ранее [30] (см. рис. 3 и табл. 3), и выражали в процентах от актив-

ности синтетического гормона [35]:

$$C = \frac{D_{50}}{D'_{50}} \cdot 100\%,$$

где D_{50} — доза люлиберина, уменьшающая в 2 раза связывание [^{125}I]люлиберина с антисывороткой к этому гормону; D'_{50} — доза аналога, уменьшающая в 2 раза связывание [^{125}I]люлиберина с антисывороткой к люлиберину.

Определение биологической активности аналогов люлиберина. В экспериментах по определению биологической и антагонистической активностей аналогов люлиберина использовали самок крыс линии Wistar в возрасте 23—26 дней. Биологическую активность аналогов определяли по стимуляции секреции лютропина *in vivo*. Животным вводили в хвостовую вену 0,2 мл физиологического раствора, содержащего люлиберин или его аналог. Через 20 мин после инъекции животных декапитировали. Сыворотку хранили при -40° . Концентрацию лютропина в сыворотке измеряли, используя гетерологичный иммунохимический метод определения этого гормона, описанный ранее [29]. Наблюдалась линейная зависимость между количеством введенного люлиберина и концентрацией лютропина в сыворотке (рис. 1).

Определение антагонистической активности аналогов (2)—(4). Антагонистическую активность аналогов оценивали по их способности ингибировать *in vitro* секрецию лютропина, стимулируемую люлиберином (см. рис. 1). После декапитации крыс гипофизы быстро переносили по одному в инкубационные сосуды, содержащие по 0,5 мл среды Эрла, и инкубировали при 37° в атмосфере O_2 (95%) и CO_2 (5%). Через 1,5 ч инкубационную среду заменяли и инкубировали еще 1 ч. Новая среда содержала люлиберин и/или его аналог. В контрольные чашки пептиды не добавляли. Каждая группа (опытная или контрольная) состояла из пяти чашек. После инкубации среду подвергали центрифугированию (4000g, 10 мин), супернатант замораживали и хранили при -40° . В среде измеряли содержание лютропина, используя радиоиммунохимический метод определения этого гормона [29].

Авторы благодарят акад. Ю. А. Овчинникова за интерес к работе и ценные советы и замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Номенклатура пептидных гормонов (1976) Биоорг. химия, **2**, 129—132.
2. Matsuo H., Baba Y., Nair R. M. G., Arimura A., Schally A. V. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1334—1339.
3. Burgus R., Butcher M., Amoss M., Ling N., Monahan M., Rivier J., Fellows R., Blackwell R., Vale W., Guillemin R. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 278—282.
4. Sievertsson H., Chang J. K., Bogentoft C., Currie B. L., Folkers K., Bowers C. Y. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1566—1571.
5. Matsuo H., Arimura A., Nair R. M. G., Schally A. V. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **45**, 822—827.
6. Monahan M. W., Rivier J., Burgus R., Amoss M., Blackwell R., Vale W., Guillemin R. (1971) *C. r. Acad. Sci., Ser. D*, **273**, 508—510.
7. Monahan M. W., Rivier J. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1100—1105.
8. Rivier J., Vale W., Burgus R., Ling N., Amoss M., Blackwell R., Guillemin R. (1973) *J. Med. Chem.*, **16**, 545—549.
9. Rivaille P., Robinson A., Kamen M., Milhaud G. (1971) *Helv. chim. acta*, **54**, 2772—2775.
10. Voelker W., Zech K. (1972) *Chimia*, **26**, 313—314.
11. Flouret G. R., Arnold W. H., Cole J. W., Morgan R. L., White W. F., Hedlung M. T., Rippel R. H. (1973) *J. Med. Chem.*, **16**, 369—373.
12. Yanaihara N., Yanaihara C., Sakagami M., Tsuji K., Hashimoto T., Kaneko T., Oka H., Schally A. V., Arimura A., Redding T. W. (1973) *J. Med. Chem.*, **16**, 373—377.

13. Geiger R., König W., Wissmann H., Geisen K., Enzmann F. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **45**, 767—773.
14. Fujino M., Fukuda T., Kobayashi S., Obayashi M. (1973) *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 87—91.
15. Schafer D. J., Black A. D. (1973) *Tetrahedron Lett.*, **41**, 4071—4074.
16. Bajusz S., Turan A., Fauszt I., Borvendég J., Hermann J. (1974) *Acta pharm. hung.*, **44**, 19—24.
17. Shigezane K., Hatsuno S., Takamura N., Mizoguchi T., Sugawara S. (1975) *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2696—2700.
18. Bayev V. V., Miroshnikov A. I., Bakalkin G. Ya., Antonov A. S. (1976) *Abstracts, USSR — FRG Symp. Chem. Pept. Proteins*, Dushaube, p. 81.
19. Okada Y., Kitamura K., Baba Y., Arimura A., Schally A. V. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1180—1186.
20. Monahan M. W., Rivier J., Vale W., Guillemin R., Burgus R. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **47**, 551—556.
21. Humphries J., Fisher G., Wan Y.-P., Folkers K., Bowers C. Y. (1974) *J. Med. Chem.*, **17**, 569—571.
22. Rees R. W. A., Foell T. J., Chai S.-Y., Grant N. (1974) *J. Med. Chem.*, **17**, 1016—1019.
23. Стюарт Дж., Янг Дж. (1971) Твердофазный синтез пептидов, «Мир», М.
24. Sakakibara S. (1971) in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins* (Weinstein B., ed.), vol. 1, pp. 51—58.
25. Аваева С. М., Краснова В. И. (1975) *Биоорганич. химия*, **1**, 1600—1605.
26. Riordan J. F., Sokolovsky M., Vallee B. L. (1967) *Biochemistry*, **6**, 358—361.
27. Previero A., Coletti-Previero M. A., Cavadore J.-C. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, **147**, 453—461.
28. Scoffone E., Fontana A., Rocchi R. (1968) *Biochemistry*, **7**, 971—979.
29. Индифорова Г. П., Антонов А. С., Кривошеев О. Г., Исаченков В. А. (1977) *Пробл. эндокринолог.*, **23** (1), 74—79.
30. Бакалкин Г. Я., Ярагин К. Н., Исаченков В. А. (1976) *Пробл. эндокринолог.*, **22** (6), 72—76.
31. Yanaihara N., Tsuji K., Yanaihara C., Hashimoto T., Kaneko T., Oka H., Arimura A., Schally A. V. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **51**, 165—173.
32. Labrie F., Savary M., Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V. (1976) *Endocrinology*, **98**, 289—294.
33. Okada Y., Kitamura K., Baba Y., Arimura A., Schally A. V. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1180—1186.
34. Kurath P., Thomas A. M. (1973) *Helv. chim. acta*, **56**, 1656—1661.
35. Arimura A., Sato H., Coy D. H., Worobe R. B., Schally A. V., Yanaihara N., Hashimoto T., Yanaihara C., Sakura N. (1975) *Acta Endocrinol.*, **78**, 222—231.

Поступила в редакцию
29.VIII.1977

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF LULIBERIN AND ITS ANALOGS

BAYEV V. V.*, MIROSHNIKOV A. I.*, BAKALKIN G. Ya.,
KOMISSAROVA E. N., ISACHENKOV V. A.

* *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow; Central Research Laboratory,
4th Main Department of the USSR Ministry of Health, Moscow*

A convenient method has been suggested for synthesis of hypothalamic releasing hormone luliberin and its analogs starting from glycine benzhydrylamide. Relying upon this procedure, luliberin along with Leu^{2,3}-luliberin and C-terminal hexapeptide have been prepared. Four new analogs have been obtained by modification of His, Trp, or Tyr residues in luliberin. Using solid-phase approach, luliberin and its des-His² and D-Phe²-analogs have been synthesized. For all the above compounds biological and immunochemical activities have been assayed. It has been shown that aromatic residues, especially His, are essential for manifestation of biological activity, including antagonistic properties of analogs modified in position «2».