



УДК 547.964.4.057:577.175.325.02:577.112.6.017

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ
АНАЛОГОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА КОРТИКОТРОПИНА*Лиенкаула И. К., Скуиньш А. А., Романовский П. Я.,**
*Порункевич Е. А., Раткевич М. П., Чипенс Г. И.**Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига;*
** Экспериментальный завод ИОС Академии наук ЛатвССР, Рига*

Синтезированы и исследованы линейные и циклические аналоги специфического активного центра молекулы АСТН: $[\text{Lys}^5]\text{ACTH-(5-10)-}$, $[\text{Lys}^5, \text{cyclo}(\text{Gly}^{10} \rightarrow \rightarrow \text{Lys}^5)]\text{ACTH-(5-10)-гексапептиды}$, $[\text{Lys}^5(\text{Gly})]\text{ACTH-(5-10)-}$ и $[\text{Lys}^5, \text{Gly}^{11}, \text{cyclo}(\text{Gly}^{11} \rightarrow \rightarrow \text{Lys}^5)]\text{ACTH-(5-11)-гептапептиды}$. Циклические структуры фиксированы ковалентной связью между COOH -группой C -концевого глицила и $\epsilon\text{-NH}_2$ -группой лизина. Для конденсации фрагментов применены следующие методы: азидный, пентафторфениловых эфиров, ДСС/НОВТ. Циклизация осуществлена с использованием дифенилфосфорилзида или пентафторфениловых эфиров. Результаты исследования меланоцитостимулирующей активности на изолированной коже лягушки показали, что циклоаналоги на 2–3 порядка активнее своих линейных предшественников. Стероидогенной активностью в изолированных клетках надпочечников крыс на уровне активности АСТН-(5–10)-гексапептида обладает лишь $[\text{Lys}^5, \text{Gly}^{11}, \text{cyclo}(\text{Gly}^{11} \rightarrow \rightarrow \text{Lys}^5)]\text{ACTH-(5-11)-гептапептид}$. Результаты биологических исследований подтверждают предположение о возможности образования квазициклических структур в районе специфического активного центра молекулы АСТН для взаимодействия с клеточным рецептором.

Важным фактором, определяющим специфичность взаимодействия пептидного лиганда с клеточными рецепторами, является комплементарность пространственных структур их активных участков. Исследованием структурно-функциональной организации различных по происхождению и биологическим функциям пептидов установлено, что в большинстве случаев их молекулы содержат два рядом расположенных функционально активных участка: специфический, обеспечивающий селективность гормон-рецепторного взаимодействия, и общий, неспецифический, повышающий активность первого на несколько порядков [1]. Анализ наиболее вероятных пространственных структур ряда пептидов показал, что одной из функций общих фрагментов является участие в фиксации пространственной квазициклической структуры специфического фрагмента молекулы [2]. Первые данные, подтверждающие возможность существования квазициклических структур для линейных соединений, были получены при исследовании брадикинина [3], каллидина и ряда других соединений, циклические аналоги которых обладали высокой биологической активностью [4]. Это дало возможность высказать предположение, что формирование компактных квазициклических структур при связывании с липофильным рецептором — универсальный принцип функционирования природных пептидных регуляторов [2].

С целью дальнейшего изучения структурно-функциональной организации кортикотропина нами была исследована возможность образования квазициклических структур в молекуле гормона. О целесообразности проводимых исследований говорило показанное нами ранее сходство структурной и функциональной организации кортикотропина и кивина из яда осы, аминокислотная последовательность которого включает структуру брадикинина [5]. Логично было предположить, что это сходство распространяется и на принципы организации пространственной структуры гор-

Сокращения: АСТН — кортикотропин, DMF — диметилформамид, Pfp — пентафторфенил, ONb — пнробензил, ДСС — $\text{N}_2\text{N}'$ -дидихлорексимкарбонимид, НОВТ — 1-оксibenзотриазол, $\text{H}_4\text{-furan}$ — тетрагидрофуран.

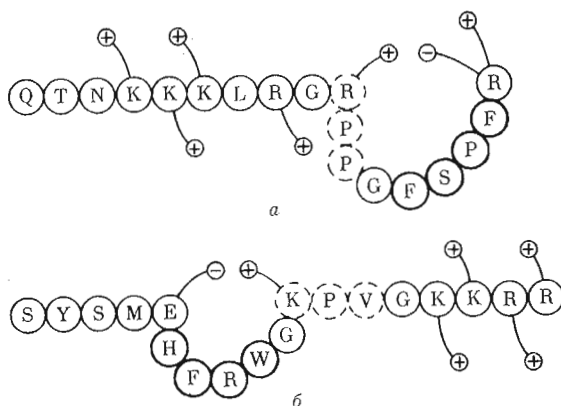
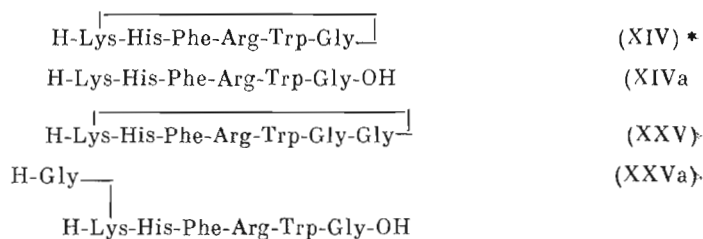


Рис. 1. Гипотетические квазициклические структуры кинина из яда оси (а) и фрагмента 1–18 кортикотропина (б). Пунктирные кружки – аминокислотные остатки (приведены в однобуквенном коде) общего фрагмента, темные кружки – аминокислотные остатки минимального специфически активного фрагмента

монов, т. е., как и в случае брадикинина, в молекуле кортикотропина в районе специфического активного фрагмента (5–10), рядом с которым находится общий фрагмент (11–14) [6], возможно образование квазициклических структур (рис. 1). Для экспериментальной проверки этого предположения нами были синтезированы циклические аналоги специфического активного фрагмента АСТН, а также их линейные предшественники:



Часть результатов работы по синтезу и исследованию циклоаналогов (XIV) и (XXV) представлена в сообщении [7].

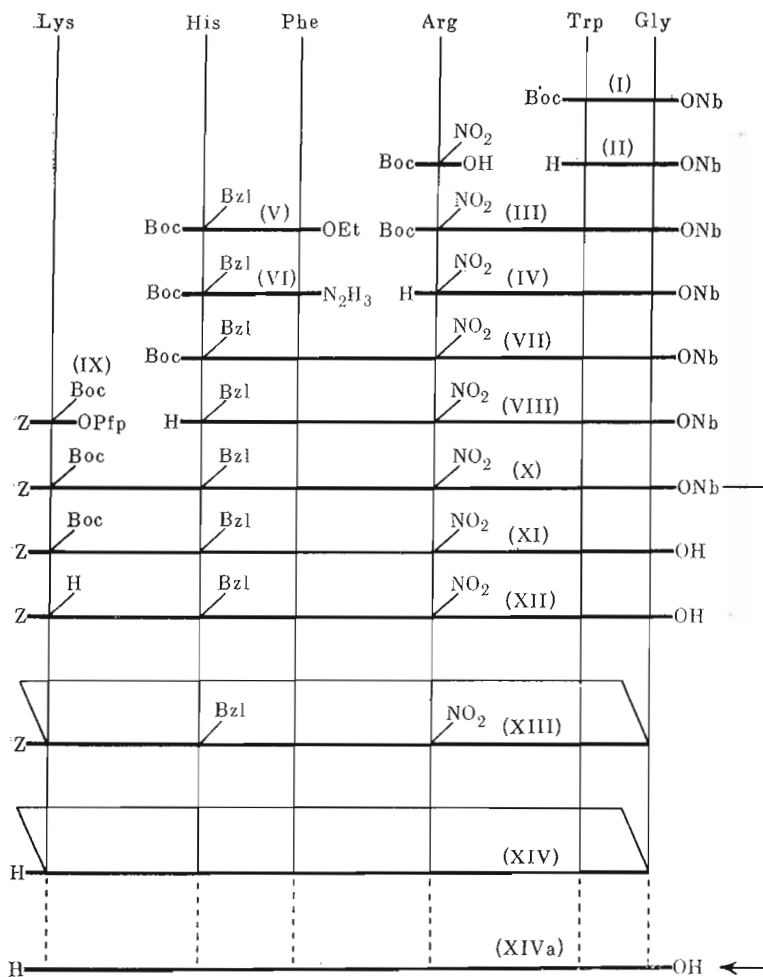
Циклическая структура соединения (XIV) фиксирована ковалентной связью между COOH-группой С-концевого глицина и ϵ -NH₂-группой лизина в положении 5 (известно, что замена остатка Glu⁵ на Arg⁵ в АСТН-(5–10)-гексапептиде повышает его липолитическую активность [8], в то время как стероидогенная активность изменяется незначительно [9]). Замыкание цикла моделирует лишь структурообразующую роль боковых цепей аминокислотных остатков в положениях 5 и 11. При этом следует также учесть, что биологическая активность природных циклопептидов, например окситоцина, сильно зависит от оптимальных размеров цикла (см. обзор [10]).

Так как замыкание цикла пептидной связью между ϵ -аминогруппой лизина и карбоксильной группой глицина приводит к уменьшению размера гипотетического цикла (петли) в этом районе (рис. 1), мы синтезировали также аналог (XXV) с увеличенным размером цикла за счет введения дополнительного остатка глицина между ϵ -аминогруппой лизина и С-концевой карбоксильной группой.

Для синтеза циклоаналогов использованы такие комбинации защитных групп, которые позволяют селективно, на стадии предшествующей циклизации, деблокировать функциональные группы, участвующие в реакции циклизации, не затрагивая при этом защитные группы других боковых цепей. В качестве временной N^α-защитной группы использовали Вос-группу,

* Нумерацию соединений см. в «Экспериментальной части».

Схема 1



N^α-аминогруппу N-концевого лизина блокировали Z-группой. Для защиты N^ε-функции аргинина использовали NO₂-группу, для N^m-гистидина — Bzl-группу при синтезе соединения (XIV) и Boc-группу — при синтезе соединения (XXV). C-Концевую ONb-группу селективно отщепляли по методу, предложенному в работе [11].

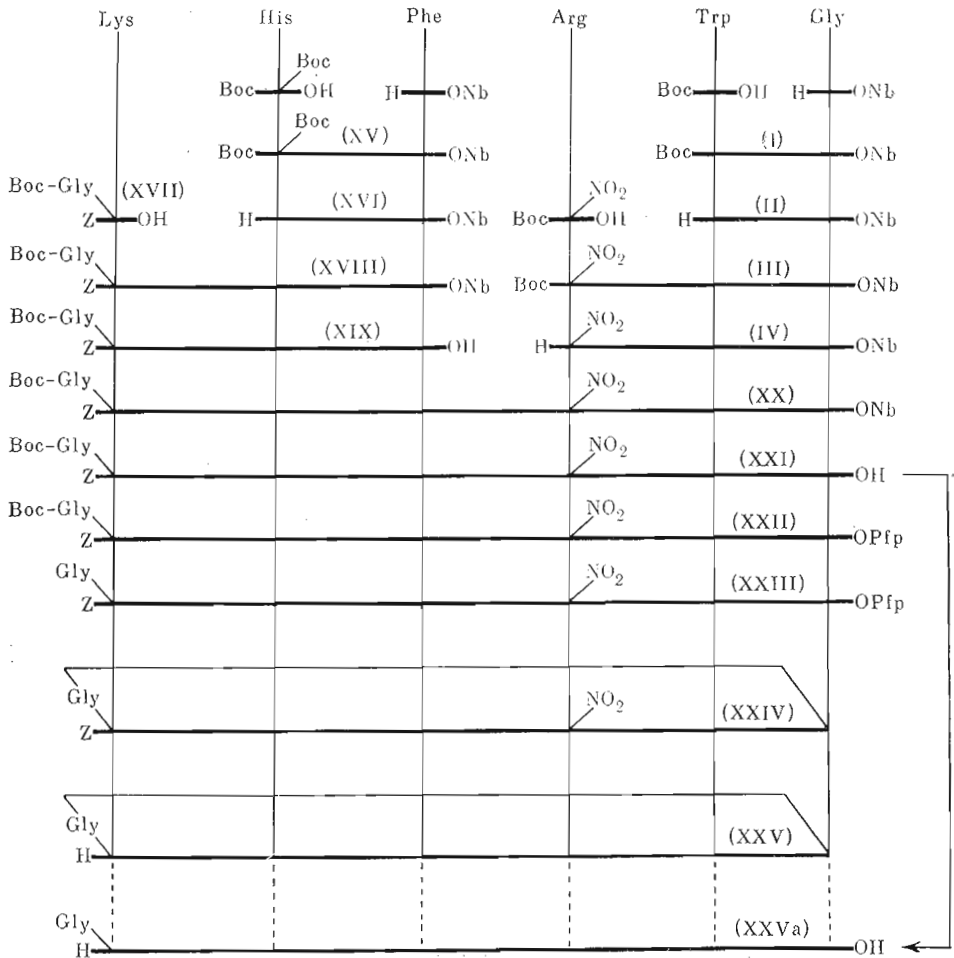
В синтезе циклоаналога (XIV) для конденсации фрагментов 2+3 использован азидный метод (схема 1). Z-Lys(Boc) вводили в пептидную цепь методом пентафторфениловых эфиров. Циклизацию осуществляли с помощью дифенилфосфорилзида [12].

Синтез циклоаналога (XXV) осуществляли конденсацией фрагментов 4+3 согласно схеме 2. В качестве конденсирующего агента использовали комплекс DCC и пентафторфенола (комплекс F). При циклизации защищенного гептапептида использовали его пентафторфениловый эфир.

Линейные предшественники циклоаналогов (XIV) и (XXV) получены из промежуточных продуктов (XII) и (XXI) после отщепления защитных групп каталитическим гидрогенолизом.

Исследована специфическая биологическая активность синтезированных соединений: способность стимулировать синтез кортикостероидов в изолированных пучковых клетках надпочечников крыс, а также меланостимулирующая активность *in vitro* на изолированной коже лягушки. Результаты исследования стероидогенной активности показали преимущественно расширенного цикла, так как соединение (XIV) оказалось неактивным в концентрациях до 500 мкг/мл ($6 \cdot 10^{-4}$ М), а соединение (XXV) обладало стероидогенным эффектом, сравнимым с эффектом линейного АСТН-(5–10)-гексапептида (Serva, ФРГ) (таблица).

Схема 2



Соединения (XXV) и АСТН-(5-10)-гексапептид обладают статистически достоверным ($P \leq 0,05$) эффектом в пределах концентраций 10^{-6} – 10^{-4} М: оба соединения вызывают такое же максимальное повышение содержания кортикостерона в инкубационной среде, как и АСТН(1-24) при концентрации $3,4 \cdot 10^{-9}$ М ($100,0 \pm 21,8\%$) (таблица). ES_{50} * для АСТН(1-24), соединения (XXV) и АСТН-(5-10)-гексапептида составляют соответственно $(0,85-3,42) \cdot 10^{-11}$, $3,15 \cdot 10^{-6}$ и $6,25 \cdot 10^{-6}$ М.

Изучение меланоцитостимулирующей активности соединений показало иной характер взаимоотношений в ряду линейных и циклических аналогов АСТН (рис. 2). Представленные на рисунке результаты статистически достоверны при потемнении кожи $>10\%$. Оба циклических аналога (XIV) и (XXV) оказались активнее своих линейных предшественников (XIVa) и (XXVa) на 2–3 порядка. В случае соединения (XXV) изменение активности выражено сильнее.

Таким образом, циклизация фрагмента АСТН-(5-10)-гексапептида приводит к изменению спектра биологической активности: значительно повышается меланоцитостимулирующая активность циклоаналогов, в то время как стероидогенная активность остается на прежнем уровне у соединения (XXV) и даже отсутствует у соединения (XIV).

Таким образом, полученные результаты указывают на существование стереоспецифичности при взаимодействии молекулы гормона с рецепторами в различных клетках-мишенях. Сохранение стероидогенной актив-

* ES_{50} – концентрация исследуемого соединения, при которой достигается половина от максимального эффекта.

Стероидогенная активность [Lys⁵, Gly¹¹, *cyclo* (Gly¹¹—⁸Ly⁵)]
АСТН-(5-11)-гептапептида (XXV) и АСТН-(5-10)-гекса-
пептида (Serva) в изолированных клетках надпочечников
крыс

Соединение	Концентрация, М	Активность *, %
(XXV)	1,1·10 ⁻⁶	34,3±6,2
	1,1·10 ⁻⁵	68,7±9,3
	1,1·10 ⁻⁴	103,1±12,5
АСТН-(5-10)-гекса- пептид	1·10 ⁻⁶	0
	5·10 ⁻⁶	29,5±2,5
	1·10 ⁻⁵	93,1±5,0

* Вычислена в процентах от эффекта АСТН-(1-24), максимальная активность которого, достигаемая при концентрации 3,4·10⁻⁹ М, принята за 100% (±21,8%).

ности у аналога (XXV) и высокая меланоцитостимулирующая активность соединений (XIV) и (XXV) свидетельствуют об образовании петли или изгиба в этом районе при взаимодействии гормона с рецептором.

Цель наших дальнейших исследований — изучение циклических аналогов, включающих в свой состав оба функционально активных участка — специфический и неспецифический.

Экспериментальная часть

Для синтеза использовали производные аминокислот фирмы Reanal (Венгрия). Упаривание проводили на вакуумном испарителе при 40° С. Температуры плавления, которые определяли в открытых капиллярах, даны без исправления. Индивидуальность полученных соединений проверяли с помощью ТСХ на пластинках Merk DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄. Приведены хроматографические подвижности (*R_f*) в системах: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:5, верхняя фаза (А), бензол — этилацетат, 1:1 (Б), хлороформ — этанол — этилацетат — уксусная кислота — вода, 85:5:8:2:0,25 (В), этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 60:20:6:11 (Г), *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 4:1:1:2 (Д), хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 120:41:6:6 (Е), этилацетат — *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 42:24:21:6:10 (Ж), система В — изопропиловый спирт, 4:1 (З), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 85:10:5 (И), хлороформ — этанол — *n*-бутанол — этилацетат — вода, 10:6:4:3:1 (К), этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 120:20:6:11 (Л), этилацетат — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 2:1:1:1 (М), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (Н), *n*-бутанол — этанол — уксусная кислота — вода, 80:10:5:30 (О), *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 5:10:6:4 (П), хлороформ — *n*-бутанол — этанол — этилацетат — вода, 45:4:16:3:1 (Р).

Электрофоретическую подвижность по отношению к гистидину (*E_{HIS}*) определяли на бумаге FN-15 (ГДР) в 5 н. (рН 1,9) уксусной кислоте. Вещества обнаруживали в УФ-свете, а также с помощью нингидрина, реагентов Эрлиха, Сакагучи, Бартона и хлор-бензидина. Аминокислотный анализ выполняли на анализаторе Biocal BC-200 после 24-часового гидролиза пептидов в запаянной ампуле при 110° С. Данные аминокислотного анализа приведены без учета разложения аминокислот. Удельное вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer 141 (США). Элементный анализ (С, Н, N) соединений удовлетворительно совпал с теоретическим.

Boc-Trp-Gly-ONb (I). К раствору 8,6 г (20 ммоль) *Boc-Trp-ONp* в 25 мл DMF добавляли 7,65 г (20 ммоль) *Tos-OH·Gly-ONb* и 2,7 мл (25 ммоль) *N*-метилморфолина. Перемешивали 1 ч и оставляли на 12 ч при 20° С. Реакционную смесь выливали в 200 мл воды, экстрагировали этилацетатом (3×80 мл). Органический слой промывали 5% K₂CO₃

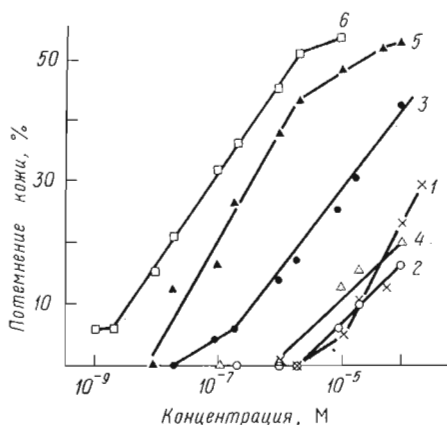


Рис. 2. Меланоцитостимулирующая активность фрагментов АСТН на изолированной коже лягушки: 1 — АСТН-(5-10)-гептапептид, 2 — соединенный (XIVa), 3 — (XIV), 4 — (XXVa), 5 — (XXV), 6 — АСТН-(1-24)-тетракозапептид

(2×100 мл), водой, 10% KHSO_4 (2×100 мл), снова водой (2×100 мл). Высушивали безводным Na_2SO_4 , отфильтровывали и упаривали. Выход 8,9 г (73%). Т. пл. 90–95° С; $[\alpha]_D^{22} -12,1^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,91 (А), 0,41 (В).

HCl-H-Trp-Gly-ONb (II). К раствору 7,2 г (17,9 ммоль) соединения (I) в 20 мл муравьиной кислоты добавляли 20 мл 1,6 М раствора хлористого водорода в муравьиной кислоте. Перемешивали 20 мин и медленно выливали в 450 мл эфира. Отфильтровывали и высушивали в эксикаторе. Выход 5,9 г (94%). Т. пл. 145–150° С. R_f 0,41 (А); E_{His} 0,59 (рН 1,9).

Woc-Arg(NO₂)-Trp-Gly-ONb (III). Раствор 0,83 г (2,2 ммоль) $\text{Woc-Arg(NO}_2\text{)-OH}\cdot\frac{3}{4}\text{N}_4\text{-furan}$ в 10 мл DMF охлаждали до –20° С, добавляли 0,38 мл (2,7 ммоль) триэтиламина и 0,92 г (2,8 ммоль) пентафторфенилового эфира трихлоруксусной кислоты. Перемешивали 5 мин и добавляли раствор 1 г (2,3 ммоль) соединения (II) в 10 мл DMF и 0,32 мл (2,3 ммоль) триэтиламина. Оставляли при 20° С на 16 ч. Реакционную смесь выливали в 30 мл воды, экстрагировали 30 мл этилацетата. Органический слой промывали 5% NaHCO_3 (3×20 мл), водой, 10% KHSO_4 (3×20 мл) и снова водой. Органический слой частично упаривали, прибавляли 20 мл смеси этанол — бензол (4:1) и упаривали вновь. Остаток растворяли в 30 мл этилацетата и осаждали петролейным эфиром. Выпавший осадок фильтровали, растворяли в 5 мл хроматографической системы В и наносили на хроматографическую колонку (фирма Merck, Size C 440–37, Li Chromper TM Si 60, Lobar), элюировали системой В. Фракции элюата, содержащие чистый трипептид, объединяли, упаривали, остаток растирали с эфиром. Выход 0,4 г (25%). Т. пл. 120° С (начало разложения). R_f 0,1 (В).

HCl-H-Arg(NO₂)-Trp-Gly-ONb (IV) получали из трипептида (III) аналогично соединению (II). Выход 98%. Т. пл. 120° С (начало разложения), $[\alpha]_D^{22} +5,4^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,54 (Г), 0,59 (Д), 0,29, (Е); E_{His} 0,52 (рН 1,9).

Woc-His(Bzl)-Phe-OEt (V). К раствору 17,8 г (51,4 ммоль) Woc-His(Bzl)-OH в 100 мл DMF добавляли 10,4 г (77,1 ммоль) НОВТ. Раствор охлаждали до 0° С, добавляли 10,6 г (51,4 ммоль) DCC, раствор 11,8 г (51,4 ммоль) HCl-Phe-OEt в 20 мл DMF и 14,2 мл (102,8 ммоль) триэтиламина. Перемешивали 1 ч при 0° С и оставляли на 16 ч при 20° С. Отфильтровывали выпавший осадок, фильтрат упаривали. К остатку добавляли 150 мл этилацетата и промывали 10% KHSO_4 (3×70 мл), водой, 5% NaHCO_3 (3×70 мл) и снова водой. Органический слой упаривали, к остатку добавляли 40 мл смеси этанол — бензол (4:1) и упаривали вновь. Продукт осаждали из смеси эфир — гексан. Выход 19,58 г (73%). Т. пл. 88–92° С; $[\alpha]_D^{22} -3,3^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,92 (Е).

Woc-His(Bzl)-Phe-N₂H₃ (VI). К раствору 4 г (7,7 ммоль) соединения (V) в 25 мл метанола добавляли 15 мл гидразингидрата. Перемешивали 24 ч, упаривали, остаток промывали водой, сушили в эксикаторе. Выход 2,65 г (68%). Т. пл. 135–136° С; $[\alpha]_D^{22} -2,7^\circ$ (с 1, DMF).

Boc-His(Bzl)-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-ONb (VII). К охлажденному до -20°C раствору 3,3 г (6,4 ммоль) соединения (VI) в 25 мл DMF добавляли 10,2 мл 2,5 М раствора хлористого водорода в этилацетате, 0,98 мл (7,7 ммоль) *трет*-бутилнитрита и перемешивали 30 мин при -5°C . Реакционную смесь охлаждали до -40°C и прибавляли охлажденный до -10°C раствор 4,4 мл (26,6 ммоль) *N,N*-диизопропилэтиламина в 5 мл DMF. Когда температура повышалась до -20°C , к реакционной смеси добавляли раствор 2,7 г (4,3 ммоль) соединения (IV) в 15 мл DMF и 0,73 мл (4,26 ммоль) *N,N*-диизопропилэтиламина. Выдерживали 24 ч при 4°C . Упаривали до минимального количества DMF и выливали в воду, подкисленную 10% KHSO_4 . Отфильтровывали, на фильтре промывали 10% KHSO_4 , 5% NaHCO_3 и водой. Продукт растворяли в этаноле и осаждали эфиром. Выход 4,1 г (89%). Т.пл. 117°C (начало разложения). R_f 0,74 (E), 0,8 (K); E_{His} 0,46 (pH 1,9).

HCl-H-His(Bzl)-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-ONb (VIII). К раствору 4 г (3,7 ммоль) соединения (VII) в 40 мл муравьиной кислоты в присутствии дитиотреита и тиоанизола добавляли 40 мл 0,88 М раствора хлористого водорода в муравьиной кислоте. Оставляли на 30 мин при 20°C . Упаривали, к остатку добавляли метанол и вновь упаривали досуха. Продукт растирали в смеси этанол — эфир и высушивали. Выход 3,75 г (95%). Т.пл. 95°C (начало разложения); R_f 0,63 (E), 0,73 (Ж); E_{His} 0,68 (pH 1,9).

Z-Lys(Boc)-OPfp (IX) получали согласно методике [13]. Выход 62%. R_f 0,9 (3).

Z-Lys(Boc)-His(Bzl)-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-ONb (X). 2,7 г (2,7 ммоль) соединения (VIII) растворяли в 25 мл DMF, добавляли триэтиламин до pH 8 и 2,25 г (4,1 ммоль) соединения (IX). Через 20 мин упаривали растворитель до минимального объема и к остатку добавляли 50 мл 10% KHSO_4 . Полученный осадок пептида отфильтровывали и на фильтре промывали водой и эфиром. Выход 3,19 г (91%). Т.пл. 119°C (начало разложения). R_f 0,41 (3), 0,39 (H), 0,9 (K).

Z-Lys(Boc)-His(Bzl)-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OH (XI). 3,1 г (2,3 ммоль) соединения (X) растворяли при нагревании до 60°C в 50 мл этанола и при перемешивании добавляли по каплям раствор 4,8 г (27,6 ммоль) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ в 50 мл воды. Перемешивали 1 ч при 60°C . Добавляли K_2CO_3 до pH 7,5–8 и перемешивали 1 ч. Упаривали до $1/3$ объема и выливали в 10% KHSO_4 . Пептид (XI) отфильтровывали, на фильтре промывали 10% KHSO_4 и водой. Продукт растворяли в этаноле и осаждали эфиром. Выход 1,45 г (52%). R_f 0,61 (E); E_{His} 0,35 (pH 1,9).

HCl-Z-Lys(NH₂)-His(Bzl)-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OH (XII) получали из соединения (XI) аналогично синтезу (VIII). Выход 96%. E_{His} 0,63 (pH 1,9).

cyclo[Z-Lys-His(Bzl)-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly] (XIII). К охлажденному до 0°C раствору 1 г (0,88 ммоль) соединения (XII) в 110 мл DMF добавляли 0,3 мл (1,75 ммоль) *N,N*-диизопропилэтиламина. Реакционную смесь охлаждали до -25°C и добавляли 0,23 мл дифенилфосфорилазид. Раствор выдерживали 48 ч при -25°C , 48 ч при 2°C и 72 ч при 20°C . Упаривали до $1/4$ объема, выливали в 50 мл 10% KHSO_4 и экстрагировали 50 мл *n*-бутанола. Органический слой промывали 10% KHSO_4 (3×25 мл), водой, 5% NaHCO_3 (3×25 мл) и снова водой. Упаривали, к остатку добавляли 40 мл смеси этанол — бензол (4:1) и опять упаривали. Продукт растирали с эфиром. Выход после очистки жидкостной хроматографией на хроматографе Du Pont 830. (колонка Zorbax C_8 размером 2,12×25 см; элюент — 43% CH_3CN , 57% 0,1 М AcONH_4) 0,14 г (15%). R_f 0,65 (E), 0,56 (K); E_{His} 0,46 (pH 1,9).

$[\text{Lys}^5, \text{cyclo}(\text{Gly}^{10} \rightarrow \text{Lys}^5)]\text{ACTH-(5-10)-гексаненрид (XIV)}$. 0,14 г (0,13 ммоль) соединения (XIII) растворяли в 3 мл смеси метанол — уксусная кислота — вода (6:1:1) и гидрировали над Pd-чернью 4 сут. Pd-чернь отфильтровывали, раствор упаривали. Остаток растворяли в 1 мл этанола и осаждали эфиром. Выход после очистки жидкостной хроматографией на

хроматографе Du Pont 830 (колонка Zorbax C₈ размером 2,12×25 см; элюент — 30% CH₃CN, 70% 0,2 М AcONH₄) 0,04 г (40%). R_f 0,43 (Д); E_{His} 0,93 (рН 1,9). Аминокислотный анализ: Arg 0,82 (1), His 0,94 (1), Lys 1,31 (1), Phe 1,00 (1), Gly 1,27 (1).

Химические сдвиги C^α-протонов Gly-10 в воде при рН 7 составляют 3,77 и 1,07 м.д., при рН 2—3,82 и 1,03 м.д. Спектр ПМР получен на приборе WM-360 (Bruker, ФРГ), в качестве внутреннего стандарта использовали *tert*-бутанол.

H-Lys-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH (XIVa) получали гидрированием соединения (XII) аналогично (XIV). Выход после очистки жидкостной хроматографией на хроматографе Du Pont 830 (колонка Zorbax C₈ размером 2,12×25 см; элюент — 13% CH₃CN, 87% 0,2 М AcONH₄) 0,05 г (68%). R_f 0,13 (Д); E_{His} 1 (рН 1,9).

Boc-His(Boc)-Phe-ONb (XV). Раствор 7,86 г (15,43 ммоль) Boc-His(Boc)-OH·CCl₄ в 20 мл DMF охлаждали до -5°С и добавляли 2,8 мл (20,06 ммоль) триэтиламина и 6,6 г (20,06 ммоль) пентафторфенилового эфира трихлоруксусной кислоты. Перемешивали 10 мин и добавляли раствор 7,3 г (15,43 ммоль) Tos-OH·H-Phe-ONb в 20 мл DMF и 2,1 мл (15,4 ммоль) триэтиламина. Перемешивали 1 ч и оставляли на 16 ч при 20°С. Реакционную смесь выливали в 100 мл воды, подкисляли 10% KHSO₄ до рН 5, экстрагировали 100 мл этилацетата. Органический слой промывали 10% KHSO₄ (3×50 мл), водой, частично упаривали, прибавляли 20 мл смеси этанол — бензол (4:1) и вновь упаривали. Продукт кристаллизовали из петролейного эфира. Выход 8,9 г (91%). Т. пл. 95—98°С; [α]_D²² -3,4° (с 1, DMF); R_f 0,78 (Л), 0,96 (Г).

HCl-His-Phe-ONb (XVI). 11,25 г (17,6 ммоль) соединения (XV) растворяли в 50 мл уксусной кислоты и добавляли 150 мл 3 М раствора хлористого водорода в уксусной кислоте. Оставляли на 10 мин, упаривали до объема 50 мл и выливали в 200 мл эфира. Выход 6,37 г (71%). Т. пл. 120°С (начало разложения). [α]_D²² -3,7° (с 1, DMF); R_f 0,58 (Д), 0,61 (М); E_{His} 0,96 (рН 1,9).

Z-Lys(Boc-Gly)-OH (XVII). К суспензии 1 г (3,58 ммоль) Z-Lys-OH в 5 мл DMF добавляли 1,22 мл (7,16 ммоль) диизопропилэтиламина и 1,02 г (3,76 ммоль) Boc-Gly-ONSu. Перемешивали 1 ч и оставляли на 16 ч при 20°С. К реакционной смеси добавляли 0,2 мл N,N-диметиламиноэтиламина. Перемешивали в течение 1 ч и выливали в 50 мл воды, которую подкисляли 10% KHSO₄ до рН 5. Выпавшее масло экстрагировали 50 мл этилацетата. Органический слой промывали 10% KHSO₄ (3×20 мл), водой, частично упаривали, прибавляли 20 мл смеси этанол — бензол (4:1) и упаривали вновь. К остатку добавляли 40 мл смеси эфир — гексан (1:1), растирали, смесь сливали и остаток упаривали. Выход 0,97 г (62%). Т. пл. 71—73°С; [α]_D²² -7,6° (с 1, DMF); R_f 0,75 (Н).

Z-Lys(Boc-Gly)-His-Phe-ONb (XVIII). К раствору 2,9 г (6,6 ммоль) соединения (XVII) в 20 мл DMF добавляли 5,3 г комплекса «F» (DCC/пентафторфенол, 1:3). Перемешивали 1 ч, отфильтровывали выпавший осадок и к фильтрату добавляли раствор 3,7 г (7,26 ммоль) соединения (XVI) и 2,4 мл (21,78 ммоль) N-метилморфолина. Перемешивали 1 ч и оставляли на 16 ч при 20°С. Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат выливали в воду, подкисленную 10% KHSO₄ до рН 5. Экстрагировали 50 мл *n*-бутанола. Органический слой промывали 10% KHSO₄ (3×25 мл), водой и упаривали. Продукт кристаллизовали из эфира. Выход 5,1 г (89%). [α]_D²² -15,9° (с 1, DMF); R_f 0,58 (Л), 0,69 (Н).

Z-Lys(Boc-Gly)-His-Phe-OH (XIX) получали из соединения (XVIII) аналогично (XI). Выход 79%. Т. пл. 125—130°С; [α]_D²² -8,7 (с 1, DMF); R_f 0,5 (А), 0,72 (Г); E_{His} 0,51 (рН 1,9).

Z-Lys(Boc-Gly)-His-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-ONb (XX). К раствору 0,56 г (0,77 ммоль) соединения (XIX) в 5 мл DMF добавляли 0,61 г (0,8 ммоль) комплекса «F». Перемешивали 1 ч. Выпавший осадок отфильтровывали и к фильтрату добавляли раствор 0,54 г (0,85 ммоль) соединения (IV) в 3 мл DMF и 0,09 мл (0,85 ммоль) N-метилморфолина.

Перемешивали 1 ч и оставляли на 16 ч при 20°С. Отфильтровывали выпавший осадок, выливали в 50 мл воды, подкисляли 10% KHSO_4 до pH 5 и экстрагировали 25 мл *n*-бутанола. Органический слой промывали водой и упаривали. Продукт кристаллизовали из эфира. Выход 0,96 г (95%). Т.пл. 100°С (начало разложения). $[\alpha]_D^{25} -13,4^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,6 (А), 0,66 (Г); E_{HIS} 0,48 (pH 1,9).

Z-Lys(Boc-Gly)-His-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OH (XXI) получали из соединения (XX) аналогично (XI). Выход 73,5%. R_f 0,45 (Г), 0,42 (А); E_{HIS} 0,44 (pH 1,9).

Z-Lys(Boc-Gly)-His-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OPfp (XXII). К раствору 0,53 г (0,45 ммоль) соединения (XXI) в 10 мл DMF добавляли 0,69 г комплекса «F». Перемешивали 1 ч и оставляли на 16 ч при 20°С. Отфильтровывали осадок, фильтрат упаривали и продукт кристаллизовали из эфира, сушили в эксикаторе. Выход 0,5 г (94%).

HCl·Z-Lys(Gly)-His-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OPfp (XXIII) получали из соединения (XXII) аналогично синтезу (VIII). Выход 91%. E_{HIS} 0,66 (pH 1,9).

cyclo[Z-Lys-His-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-Gly-] (XXIV). К 550 мл диоксана добавляли 0,88 мл диизопропилэтиламина и раствор 1,15 г (1,03 ммоль) соединения (XXIII) в 50 мл DMF. Перемешивали 64 ч, упаривали и остаток кристаллизовали из эфира. Продукт высушивали и на фильтре промывали 10 мл воды. Выход после очистки хроматографией на хроматографе Jobin Ivon Chromatospak Prep 10 (сорбент — силикагель Н60 фирмы «Merck»; элюент — система Р) 0,05 г (6%). R_f 0,38 (О); E_{HIS} 0,46 (pH 1,9).

$[\text{Lys}^5, \text{Gly}^{11}, \text{cyclo}(\text{Gly}^{11} \rightarrow \text{Lys}^5)]\text{ACTH-(5-11)-гептапептид}$ (XXV) получали из соединения (XXIV) аналогично (XIV). Выход после очистки ионообменной хроматографией на колонке (2×10 см) с СМ-целлюлозой 17%. Элюцию проводили в градиенте AcONH_4 : 0,01 М, pH 4,5 → 0,25 М, pH 6,7. R_f 0,79 (П), 0,34 (Д); E_{HIS} 0,98 (pH 1,9). Аминокислотный анализ: Arg 0,83 (1), His 0,93 (1), Lys 1,0 (1), Phe 1,0 (1), Gly 2,38 (2). В масс-спектре (полевая десорбция) обнаружены квазимолекулярные пики 891 ($M+\text{Na}$)⁺, 907 ($M+\text{K}$)⁺, 850 ($M-\text{H}_2\text{O}$)⁺, 869 ($M+1$)⁺. Спектр получен на приборе Varian MAT CM-5DF с приставкой E1-FD (США).

H-Lys(Gly)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH (XXVa) получали из соединения (XXI) после отщепления Boc-группы как описано для соединения (VIII) и каталитического гидрогенолиза, проведенного по аналогии с соединением (XIV). Выход после очистки жидкостной хроматографией на хроматографе Du Pont 830 (колонок Zorbax C₈ размером 2,12×25 см; элюент — 16% CH_3CN , 84% 0,2 М AcONH_4) 19%. R_f 0,27 (Д); E_{HIS} 0,95 (pH 1,9).

Стероидогенную активность соединений *in vitro* определяли согласно [14]. Для количественной оценки стероидогенного эффекта пептидов были рассчитаны величины EC_{50} -концентрации пептидов, при которой достигается 1/2 максимального эффекта. Стероидогенный эффект пептидов выражен в процентах от максимального эффекта АСТН-(1-24)-тетракозапептида, который принимали за 100%.

Меланоцитостимулирующую активность соединений *in vitro* определяли по методу Шизуме и др. [15] с некоторыми модификациями. Все исследования проводили на лягушках (*Rana temporaria*), которых содержали при постоянном освещении на белой поверхности в течение по крайней мере 24 ч перед экспериментом. Кожи отмывали в течение 2 ч в растворе Рингера (6,5 г NaCl, 0,14 г KCl, 0,2 г NaHCO_3 и 0,12 г CaCl_2 на 1 л воды), затем инкубировали 1 ч с $1,7 \cdot 10^{-7}$ М АСТН-(1-24)-тетракозапептида («Synacthen» фирмы Giba-Geigy AG, Швейцария). После повторного отмывания кож в растворе Рингера в течение 1 ч отбирали для исследований образцы кож, учитывая при этом критерии Кастина и др. [16]. Концентрацию исследуемого вещества, дающую минимальный ответ, добавляли к группе кож (не менее 5 в группе) и через 15 мин измеряли отражение. Это повторяли с возрастающими концентрациями пептида. Отражение кожи измеряли на приборе Photovolt (США). Потемнение кожи в процентах рассчитывали по формуле $(1-b/a) \cdot 100\%$, где *a* — на-

чальное отражение кожи, *b* — отражение кожи после инкубации в растворе исследуемого вещества.

Статистическую обработку результатов проводили по [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Чипенс Г. И. В кн.: Химия и биология пептидов. Рига: Зинатне, 1971, с. 23–47.
2. Чипенс Г. И. В кн.: Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980, с. 11–124.
3. Ivanov V. T., Filatova M. P., Reissmann S., Reutova T. O., Efremov E. S., Pashkov V. S., Galaktionov S. G., Grigorian G., Ovchinnikov Yu. A. In: Peptides. Chemistry, structure and biology/Eds Walter R., Meienhofer J. Ann. Arbor: Ann Arbor Science, 1975, p. 151–157.
4. Chipens G. I., Mutulis F. K., Galaktionov S. G. In: (IUPAC) Frontiers of bioorganic chemistry and molecular biology/Ed. Ananchenko S. N. Oxford: Pergamon Press, 1980, p. 99–103.
5. Chipens G. I., Mutulis F. K., Romanovskis P. J., Porunkevich E. A., Kublis G. G., Skujins A. A., Makarova N. A. In: Peptides 1978/Eds Siemion I., Kupryszewski G. Wroclaw: Wroclaw Univ. Press, 1979, p. 601–605.
6. Чипенс Г. И. В кн.: Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980, с. 234–246.
7. Romanovskis P. J., Siskov I. V., Liepkaula I. K., Porunkevich E. A., Ratkevich M. P., Skujins A. A., Chipens G. I. In: Peptides. Chemistry, structure and function. Proc. 7th Amer. Peptide Symp./Eds Rich D. H., Gross E. Rockford: Pierce Chem. Company, 1981, p. 229–232.
8. Draper M. W., Rizak M. A., Merrifield R. B. Biochemistry, 1975, v. 14, № 13, p. 2933–2938.
9. Jean-Baptiste E., Draper M. W., Rizak M. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 10, p. 4329–4331.
10. Шредер Э., Любке К. В кн.: Пептиды. М.: Мир, 1969, т. 2, с. 419–420.
11. Романовский П. Я., Хенклейн П., Бендерс Ю. А., Сысков И. В., Чипенс Г. И. В кн.: V Всес. симпозиум по химии и физике белков и пептидов. Тез. докл. Баку, 1980, с. 229.
12. 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.
13. Wünsch E. Synthese von Peptiden. Teil II. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1974, S. 55–58.
14. Скуиньш А. А., Рагкевич М. П., Кублис Г. Г., Порушкевич Е. А., Сысков И. В., Чипенс Г. И. Биохимия, 1982, т. 47, с. 1108–1112.
15. Shizuta K., Lerner A. B., Fitzpatrick T. B. Endocrinology, 1954, v. 54, p. 553–560.
16. Kastin A. J., Miller M. C., Schally A. V. Experimentia, 1969, v. 25, p. 192–193.
17. Кассандрова О. Н., Лебедев В. В. Обработка результатов наблюдения. М.: Наука, 1970.

Поступила в редакцию
10.X.1983
После доработки
21.XI.1983

POTENT CYCLIC ANALOGUES OF THE ACTH ACTIVE CENTER: SYNTHESIS AND PROPERTIES

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

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

Linear and cyclic analogues of the specific active center of the ACTH molecule have been synthesized, viz. [Lys⁵]ACTH-(5–10)-, [Lys⁵, cyclo(Gly¹⁰→^εLys⁵)]-ACTH-(5–10)-hexapeptides. [Lys⁵(Gly)]ACTH-(5–10)- and [Lys⁵, Gly¹¹, cyclo(Gly¹¹→^εLys⁵)]-ACTH-(5–11)-heptapeptides. The cyclic structures are fixed by covalent bond between the COOH-group of the C-terminal glycine and ε-amino group of a lysine residue. Azide method, DCC/HOBT or pentafluorophenyl esters are used for fragment coupling, while cyclization is achieved by means of diphenylphosphoryl azide or pentafluorophenyl esters.

Cyclic compounds are 2–3 orders of magnitude more active than their linear counterparts as revealed by assaying their melanocyte-stimulating activity in vitro on frog skin. Only the title heptapeptide possesses a steroidogenic activity similar to that of ACTH-(5–10)-hexapeptide. The results obtained are in accord with the idea implying the formation in the hormone-receptor complexes of quasi-cyclic structures in the region of the specific active center of ACTH molecule.