



УДК 547.964.4.07

ПРИРОДНЫЕ ПЕПТИДЫ И ИХ АНАЛОГИ

XXXV. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА [Ala⁵, Orn⁹] СОМАТОСТАТИНА

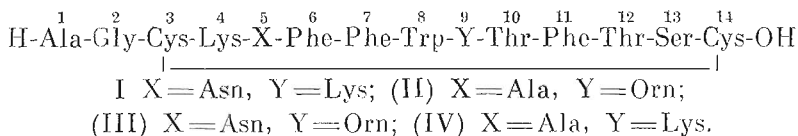
*Швачкин Ю. П., Смирнова А. П., Ермак Н. М.,
Федотов В. П., Садовникова Н. В., Плужникова Г. Н.*

*Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Осуществлен синтез нового структурного аналога соматостатина, в котором остатки Asp⁵ и Lys⁹ замещены на остатки Ala и Orn соответственно. Установлено, что [Ala⁵, Orn⁹]соматостатин сохраняет характерную для природного соматостатина способность подавлять секрецию соматотропина, инсулина, глюкагона, но в отличие от природного гормона не оказывает ингибирующего действия на секрецию пролактина.

Гормон соматостатин представляет собой гетеродетный пептид строения (I) (здесь и далее все асимметричные аминокислоты L-ряда) [1]. В настоящее время этот гормон привлекает пристальное внимание экспериментаторов и клиницистов. Ныне установлено, что соматостатин, первоначально открытый как гормон, ингибирующий секрецию соматотропина [2], обладает также способностью ингибировать секрецию инсулина, глюкагона, пролактина, тиротропина и ряда желудочно-кишечных гормонов [3, 4].

После установления химического строения соматостатина и обнаружения у этого гормона широкого спектра биологических эффектов получили интенсивное развитие работы по получению и исследованию различных структурных аналогов соматостатина, имеющие целью выяснение общих закономерностей структурно-функциональной организации гормона и создание препаратов с избирательной активностью.



При изучении закономерностей, определяющих структурно-функциональные отношения в молекуле соматостатина, весьма важен вопрос о влиянии остатка Lys⁹ на биологическую активность гормона [5, 6]. По современным представлениям [4-6], остаток Lys⁹ имеет существенное значение для проявления соматостатином специфической гормональной активности, так как положительно заряженная ε-аминогруппа этого остатка участвует в электростатическом взаимодействии с анионным центром рецептора клеток-мишеней. Возникновение указанного ионного контакта — важное условие успешного связывания гормона с рецептором [6]. Однако наличие положительно заряженной аминогруппы в боковой цепи аминокислотного остатка в положении 9 представляет собой условие необходимое, но недостаточное. Прямым экспериментальным доказательством этого является отсутствие биологической активности у [Orn⁹]соматостатина (III), полученного в результате одноточечного замещения Lys⁹ на Orn [7]. Поскольку δ-аминогруппа остатка Orn⁹ по своим электронным характеристикам не отличается от ε-аминогруппы остатка Lys⁹,

Принятые сокращения: DMF — диметилформамид, Thr — тетрагидропиранил.

можно предположить, что смещение заряженной аминокислотной группы к пептидному остову молекулы на расстояние, равное длине одного метиленового мостика (1,27 Å), приводит к внутримолекулярному экранированию этой группы и невозможности осуществления межмолекулярного электростатического взаимодействия с анионным центром рецептора, в результате чего соединение (III) оказывается неактивным.

Для компенсации нежелательных стерических эффектов, ведущих к утрате биологической активности, при конструировании новых активных аналогов соматостатина необходимо учитывать сведения о конформации молекулы соматостатина в целом и данные об особенностях внутримолекулярных взаимодействий отдельных аминокислотных остатков этой молекулы в частности.

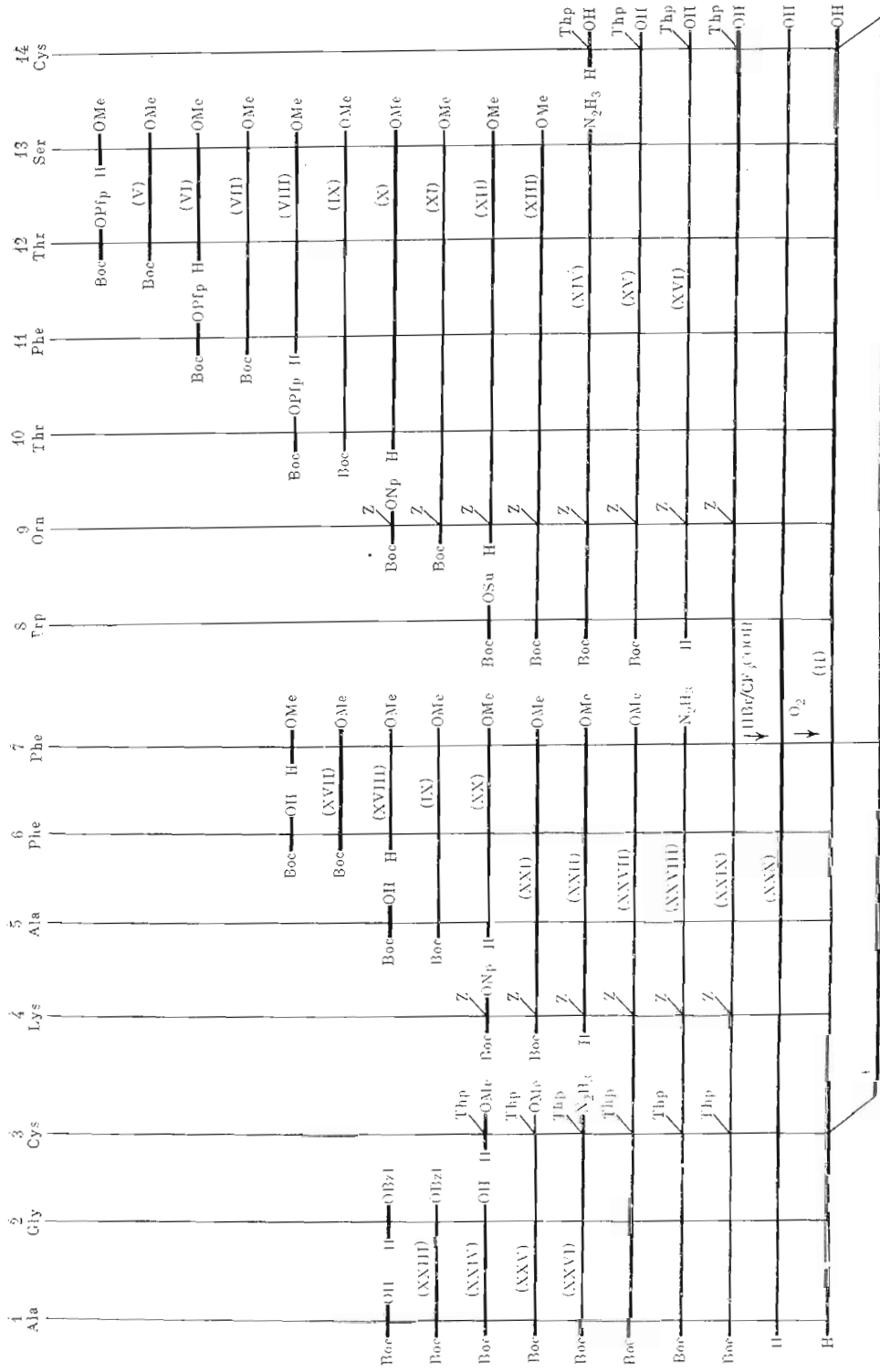
Анализ экспериментальных данных по изучению спектров кругового дихроизма, спектров ПМР, седиментационного поведения и особенностей диффузии соматостатина в водных растворах [5, 8] показывает, что в биологически активной конформации молекула соматостатина имеет форму U-образной шпильки, концы которой соединены дисульфидным мостиком между остатками Cys³ и Cys¹⁴, а в области перегиба располагается остаток Trp⁸ [8]. В этой конформации остаток Lys⁹ оказывается пространственно сближенным с остатком Asn⁵. При замещении остатка Lys⁹ на Orn δ-аминогруппа последнего, будучи смещена к α-углеродному атому, может экранироваться объемной боковой цепью остатка Asn⁵, и участие этой аминокислотной группы в гормон-рецепторном взаимодействии становится затруднительным. Выходу δ-аминогруппы остатка Orn⁹ на вандер-ваальсову поверхность молекулы за счет латеральных смещений также препятствует экранирование остатка Orn⁹ смежными остатками Trp⁸ и Thr¹⁰, имеющими объемистые боковые цепи.

Анализ пространственных отношений в молекуле соматостатина позволяет заключить, что при замене остатка Lys⁹ на остаток Orn биологическая активность нового аналога может быть сохранена лишь при одновременном замещении остатка Asn⁵ на такой аминокислотный остаток, боковая цепь которого должна удовлетворять двум следующим требованиям: 1) иметь малый объем (чтобы не вызывать пространственного экранирования δ-аминогруппы остатка Orn⁹); 2) иметь неполярную природу (чтобы исключить возможность нежелательных внутримолекулярных взаимодействий с положительно заряженной δ-аминогруппой остатка Orn⁹). Из белковых аминокислот с неполярными цепями указанным требованиям лучше всего удовлетворяет аланин. Такая замена представляется тем более целесообразной, что одноточечное замещение Asn⁵ → Ala проводилось ранее и было установлено, что [Ala⁵]соматостатин (IV) сохраняет специфическую активность природного гормона [9].

Таким образом, на основании анализа имеющихся экспериментальных данных и изложенных выше представлений об особенностях активной конформации соматостатина в растворе мы сформулировали гипотезу о том, что одновременная двухточечная замена в молекуле соматостатина остатка Lys⁹ на остаток Orn и остатка Asn⁵ на остаток Ala должна приводить к новому биологически активному аналогу соматостатина.

Для прямой экспериментальной проверки этой гипотезы мы осуществили полный химический синтез неизвестного ранее [Ala⁵, Orn⁹]соматостатина (II) и исследовали его биологическую активность.

Синтез тетрадекапептида (II) проводили блочным способом, исходя из фрагментов 1–7 и 8–14 (см. схему). Отличительной особенностью этой схемы синтеза является применение тетрагидропиранильной группировки для защиты сульфгидрильных групп в остатках Cys³ и Cys¹⁴ на промежуточных стадиях синтеза. Получение защищенного линейного тетрадекапептида (XXXIX) стыковкой двух гептапептидных фрагментов представляется наиболее предпочтительным с точки зрения тактики пептидного синтеза, так как в этих условиях целевое соединение максимально отличается по свойствам от исходных веществ. Благодаря этому выделение образующегося тетрадекапептида из реакционной смеси существенно облегчено.



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

При реализации намеченной схемы синтеза реакции конденсации проводили в условиях, сводящих возможность рацемизации отдельных аминокислотных остатков к минимуму. Ключевые стадии стыковки фрагментов осуществляли азидным методом. В то же время при синтезе коротких пептидов, включающих в качестве С-концевых аминокислотных остатков остатки глицина или стерически стабилизированных аминокислот, не обнаруживающих склонности к рацемизации, мы широко использовали метод смешанных ангидридов и метод активированных эфиров. При этом стереохимическую чистоту образующихся соединений проверяли ферментативным гидролизом контрольных проб.

Выбор защитных групп определялся требованием сведения к минимуму нежелательных побочных реакций при удалении N^α-защитных группировок на промежуточных стадиях синтеза.

Для защиты α-аминогрупп на всех этапах синтеза применяли трет-бутилоксикарбонильную группу. Карбоксильные группы С-концевых аминокислотных остатков отдельных фрагментов защищали либо этерификацией (метилловые и бензилловые эфиры), либо солеобразованием. Для защиты ω-аминогрупп в остатках Lys⁴ и Orn⁹ использовали бензилоксикарбонильную группировку. Производные всех оксиаминокислот (Thr¹⁰, Thr¹² и Ser¹³) применяли без защиты гидроксильных групп, что позволило сократить число стадий синтеза и существенно снизить его трудоемкость. Учитывая результаты ранее проведенных в нашей лаборатории кинетических исследований [10—12], оксиаминокислоты с незащищенными гидроксильными группами вводили в реакции пептидного синтеза в условиях, обеспечивающих подавление нежелательных реакций О-ацилирования, а именно: при минимальных избытках основания [10], в диметилформамиде [11], в виде пентафторфениловых эфиров [12].

Метилловый эфир защищенного гептапептида (XXVII) получали азидной конденсацией трипептида (XXVI), соответствующего фрагменту 1—3, с частично защищенным тетрапептидом (XXII), соответствующим фрагменту 4—7, и далее превращали в защищенный гептапептидгидразид (XXVIII). Фрагмент 8—13 синтезировали ступенчатым наращиванием пептидной цепи методом активированных эфиров; к полученному частично защищенному гексапептиду (XIV) азидным методом присоединяли S-тетрагидропиранилцистеин.

В результате азидной конденсации гептапептида (XXVIII), соответствующего фрагменту 1—7, с гептапептидом (XVI), соответствующим фрагменту 8—14, был получен частично защищенный тетрадекапептид (XXIX). Обработка последнего раствором бромистого водорода в трифторуксусной кислоте при использованной комбинации защитных групп обеспечивала их исчерпывающее удаление в одну стадию. В качестве протекторов применяли добавки анизол и β-меркаптоэтанола.

Образование дисульфидного мостика между остатками Cys³ и Cys¹⁴ проводили на последней стадии синтеза, подвергая деблокированный линейный тетрадекапептид (XXX) окислению кислородом воздуха при pH 6,8.

Выделение образовавшегося соединения (II) из реакционной смеси осуществляли распределительной хроматографией на колонке с сефадексом G-25 в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Для дополнительной очистки синтетический циклотетрадекапептид (II) хроматографировали на колонке с сефадексом G-25, применяя в качестве элюента 2 *n*. уксусную кислоту. В результате синтетический [Ala⁵, Orn⁹] соматостатин (II) получен в аналитически чистом состоянии.

Изучение биологической активности синтетического циклотетрадекапептида (II) проводили на первичных культурах изолированных клеток аденогипофиза и островковых клеток поджелудочной железы крыс. Специфическую гормональную активность соединения (II) оценивали по

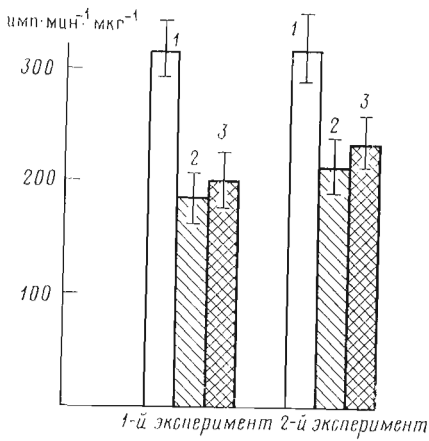


Рис. 1

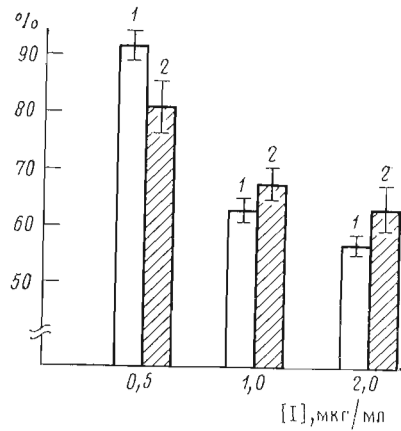


Рис. 2

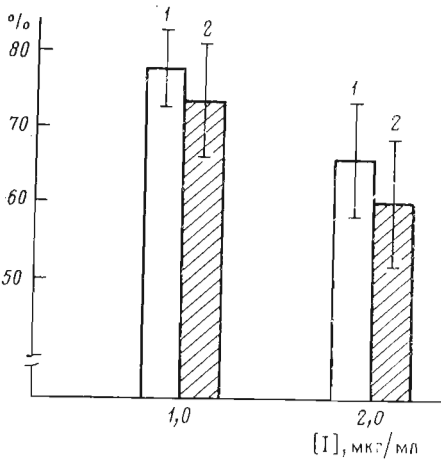


Рис. 3

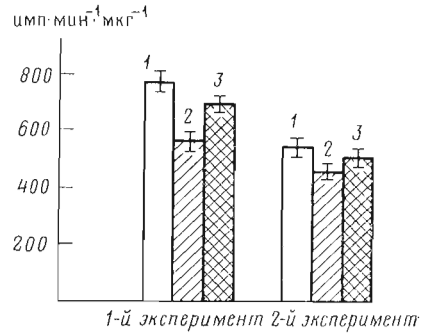


Рис. 4

Рис. 1. Влияние соматостатина (2) и его аналога (II) (3) на секрецию меченого соматотропина клетками аденогипофиза. По оси ординат – концентрация меченого соматотропина в среде (имп/(мин·мкг белка)). 1 – контроль

Рис. 2. Ингибирование соматостатином (I) и его аналогом (II) (2) секреции инсулина в культуре островковых клеток поджелудочной железы новорожденных крыс. По оси ординат – концентрация инсулина в среде в процентах по отношению к контролю

Рис. 3. Ингибирование соматостатином (I) и его аналогом (II) (2) секреция глюкагона в культуре островковых клеток поджелудочной железы новорожденных крыс. По оси ординат – концентрация глюкагона в среде в процентах по отношению к контролю

Рис. 4. Влияние соматостатина (2) и его аналога (II) (3) на секрецию клетками аденогипофиза меченого пролактина. По оси ординат – концентрация меченого пролактина в среде (имп/(мин·мкг белка))

его способности ингибировать секрецию соматотропина, пролактина, инсулина и глюкагона. В качестве стандарта сравнения во всех опытах применяли соматостатин (I) [13, 14].

Результаты экспериментов по изучению способности соединения (II) ингибировать секрецию соматотропина, инсулина и глюкагона представлены на рис. 1–3 соответственно. Приведенные результаты показывают, что $[Ala^5, Orn^9]$ соматостатин сохраняет характерную для соматостатина (I) способность подавлять секрецию соматотропина, инсулина и глюкагона, причем наблюдаемые эффекты соединения (II), как и в случае заведомого соматостатина (I), обнаруживают зависимость от дозы и статистически достоверны (фактор достоверности $P < 0,01$).

Таким образом, гипотеза о получении нового биологически активного аналога соматостатина при одновременном двухточечном замещении в молекуле природного гормона остатков Asn⁵ и Lys⁹ на остатки Ala⁵ и Orn⁹ в эксперименте полностью подтвердилась.

В опытах, проведенных на культурах изолированных клеток аденогипофиза крыс, было также изучено влияние соединения (II) на секрецию пролактина. Результаты этих экспериментов (рис. 4) показали, что соединение (II) в отличие от соматостатина (I) ингибирующего действия на секрецию пролактина практически не оказывает ($P > 0,05$).

Таким образом, в результате изучения влияния [Ala⁵, Orn⁹]соматостатина (II) на секрецию тропных гормонов аденогипофиза выявлено статистически достоверное различие эффектов соединения (II) в отношении соматотропина и пролактина.

Экспериментальная часть

Тонкослойную хроматографию всех соединений, кроме [Ala⁵, Orn⁹]соматостатина (II), проводили на стандартных пластинках Silufol UV₂₅₄ (Kavalier, ЧССР). Для хроматографирования соединения (II) применяли стеклянные пластинки с тонким слоем силикагеля марки LC 5/40 (Chemapol, ЧССР). Использовали следующие системы растворителей: хлороформ — метанол, 25:2 (А); хлороформ — метанол, 25:3 (Б); хлороформ — метанол, 25:5 (В); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (Г); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:5 (Д); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода — этилацетат, 1:1:1:1 (Е); *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 15:3:10:12 (Ж). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью ninгидрина или обработкой хроматограмм парами йода.

Для аминокислотного анализа пептиды подвергали кислотному гидролизу в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 110° С, 20 ч), после чего количественное содержание аминокислот в гидролизате определяли с помощью аминокислотного анализатора типа Technicon (США). Ферментативный гидролиз пептидов с применением лейцинаминопептидазы проводили по методике Хилла и Смита [15], используя кристаллический препарат фирмы Koch-Light. Цистеинсодержащие пептиды перед гидролизом обрабатывали надмуравьиной кислотой [16].

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

Boc-Thr-Ser-OMe (V). К охлажденному до 10° С раствору 3,11 г (20 ммоль) хлоридрата метилового эфира серина в 10 мл DMF прибавляли 2,8 мл (20 ммоль) триэтиламина. Образовавшийся осадок отфильтровывали и к фильтрату прибавляли 7,7 г (20 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*-*tert*-бутилоксикарбонилтреонина. Смесь выдерживали 1 ч при 20° С, выпавший осадок отфильтровывали, промывали DMF и объединенный фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 5 мл смеси хлороформ — метанол (25:1) и полученный раствор хроматографировали на колонке (2×50 см) с силикагелем марки «адсорбционный» (фирмы Woelm, ФРГ), используя в качестве элюента 750 мл той же смеси растворителей и отбирая фракции по 10 мл. Получили 6 г (94%) соединения (V) в виде густого бесцветного масла с R_f 0,30 (А), 0,60 (Г); $[\alpha]_D^{22} -12^\circ$ (c 1,0; MeOH).

Boc-Phe-Thr-Ser-OMe (VII) получали аналогично соединению (V) из 6 г (14 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*-*tert*-бутилоксикарбонилфенилаланина, 2,16 мл (15,6 ммоль) триэтиламина и 4 г (15,6 ммоль) хлоридрата дипептида (VI), предварительно приготовленного с выходом 91% обработкой 5,5 г (17,2 ммоль) соединения (V) 30 мл 10% раствора хлористого водорода в диоксане (45 мин, 20° С). После упаривания реакционной смеси в вакууме остаток растворяли в этилацетате и полученный раствор последовательно промывали 5% водным раствором KHSO₄, водой, 5% раствором K₂CO₃, снова водой, высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из 50 мл смеси

этилацетат — диэтиловый эфир (2:3). Получили 4,2 г (64%) соединения (VII) с т. пл. 107–108° С, R_f 0,35 (А), 0,67 (Г), $[\alpha]_D^{22} -31,0^\circ$ (с 1,0; MeOH). Найдено, %: С 56,61; Н 7,17; N 8,92. $C_{22}H_{33}N_3O_8$. Вычислено, %: С 56,50; Н 7,11; N 8,98.

Voc-Thr-Phe-Thr-Ser-OMe (IX) синтезировали аналогично соединению (VII) из 2,94 г (7,65 ммоль) пентафторфенилового эфира *трет*-бутил-оксикарбонилтреонина, 1,2 мл (8,6 ммоль) триэтиламина и 3,4 г (8,55 ммоль) хлоридата трипептида (VIII), приготовленного с выходом 98% обработкой 4 г (8,6 ммоль) защищенного трипептида (VII) 10% раствором хлористого водорода в диоксане, как описано выше. После упаривания реакционной смеси в вакууме остаток растворяли в этилацетате, раствор охлаждали, выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом и перекристаллизовывали из 25 мл смеси этилацетат — метанол (2:1). Получили 3,3 г (75%) соединения (IX) с т. пл. 169–170° С, R_f 0,26 (А), 0,68 (Г), $[\alpha]_D^{22} -29,0^\circ$ (с 1,0; MeOH). Найдено, %: С 55,13; Н 7,21; N 9,71. $C_{26}H_{40}N_4O_{10}$. Вычислено, %: С 54,96; Н 7,09; N 9,85.

Voc-Orn(Z)-Thr-Phe-Thr-Ser-OMe (XI). К раствору 2,8 г (5,55 ммоль) хлоридата тетрапептида (X), предварительно приготовленного с выходом 98% обработкой 3,2 г (5,65 ммоль) тетрапептида (IX) 10% раствором хлористого водорода в диоксане, прибавляли 3,1 г (5,65 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира N^α -*трет*-бутилоксикарбонил- N^6 -бензилоксикарбонилорнитина в 2 мл DMF, смесь охлаждали до -5° С и при перемешивании прибавляли 0,79 мл (5,65 ммоль) триэтиламина. Смесь выдерживали 1 ч при -5° С, 18 ч при 4° С, прибавляли 0,5 мл несимметричного диметилтриметилендиамина, выдерживали еще 12 ч при 4° С и выливали в 500 мл воды со льдом. Выделившийся осадок отфильтровывали, последовательно промывали 1 н. NH_4OH , водой, 5% раствором $KHSO_4$, снова водой и высушивали в вакууме над фосфорным ангидридом. После перекристаллизации из смеси этилацетат — метанол получали 3,9 г (85%) соединения (XI) с т. пл. 132–134° С, R_f 0,24 (А), 0,46 (Г), $[\alpha]_D^{22} -31,0^\circ$ (с 1,0; MeOH). Найдено, %: С 57,20; Н 7,02; N 10,31. $C_{39}H_{56}N_6O_{15}$. Вычислено, %: С 57,33; Н 6,91; N 10,28. Аминокислотный анализ: Orn 1,00 (1); Thr 2,20 (2); Phe 0,92 (1); Ser 1,05 (1).

TFA-H-Orn(Z)-Thr-Phe-Thr-Ser-OMe (XII). 3,68 г (4,5 ммоль) соединения (XI) растворяли в 50 мл смеси трифторуксусной кислоты с хлористым метиленом (1:1), полученный раствор выдерживали 1 ч при 5° С и затем упаривали в вакууме. Остаток растирали с эфиром, суспензию фильтровали и вещество с фильтра высушивали в вакууме над фосфорным ангидридом. Получали 3,5 г (93%) соединения (XII).

Voc-Trp-Orn(Z)-Thr-Phe-Thr-Ser-OMe (XIII). К раствору 3,5 г (4,2 ммоль) соединения (XII) и 1,69 г (4,2 ммоль) N -оксисукцинимидного эфира N^α -*трет*-бутилоксикарбонилтриптофана в 15 мл DMF прибавляли при охлаждении до -5° С и перемешивании 0,59 мл (4,2 ммоль) триэтиламина, смесь выдерживали 1 ч при -5° С, 18 ч при 5° С и 24 ч при 20° С, после чего прибавляли к смеси 0,5 мл несимметричного диметилтриметилендиамина. Полученную смесь выдерживали 14 ч при 4° С, а затем выливали в 500 мл воды со льдом. Выделившееся в осадок вещество отфильтровывали, последовательно промывали водой, 5% раствором $KHSO_4$, снова водой и высушивали в вакууме. После перекристаллизации из смеси этилацетат — метанол (2:1) получали 3,25 г (75%) соединения (XIII) с т. пл. 160–162° С, R_f 0,40 (В), $[\alpha]_D^{22} -24,0^\circ$ (с 1,0; MeOH). Найдено, %: С 59,68; Н 6,66; N 11,41. $C_{50}H_{66}N_8O_{14}$. Вычислено, %: С 59,86; Н 6,63; N 11,17.

Voc-Trp-Orn(Z)-Thr-Phe-Thr-Ser-N_2H_3 (XIV). К раствору 3 г (3 ммоль) соединения (XIII) в 20 мл DMF прибавляли при -5° С 4,65 мл (93 ммоль) гидразингидрата, смесь выдерживали 2 ч при 20° С, а затем выливали в холодную воду. Выделившееся в осадок вещество отфильтровывали, промывали водой, суспендировали в метаноле, полученную суспензию нагревали до кипения и охлаждали. Осадок отделяли фильтрованием. Получили 2,7 г (90%) соединения (XIV) с т. пл. 207–209° С, R_f 0,20 (Г),

$[\alpha]_D^{22} -13,0^\circ$ (c 1,0; DMF). Найдено, %: С 57,54; Н 6,63; N 13,81.

$C_{49}H_{66}N_{10}O_{13} \cdot H_2O$. Вычислено, %: С 57,63; Н 6,74; N 13,71.

Boc-Trp-Orn(Z)-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys(Thp)-OH (XV). К охлажденному до -20° С раствору 2 г (2 ммоль) соединения (XIV) в 10 мл DMF прибавляли при перемешивании 0,35 мл 8,9 н. раствора хлористого водорода в тетрагидрофуране, затем вводили 0,34 мл (3 ммоль) бутиллитрита. Раствор перемешивали 5 мин при -15° С и прибавляли к нему суспензию 0,51 г (2,5 ммоль) S-тетрагидропиранилцистеина в смеси 0,70 мл триэтиламина и 6 мл DMF. Смесь выдерживали 1 ч при -15° С, 18 ч при -5° С и 24 ч при 20° С, после чего выливали в 200 мл воды со льдом. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, 5% раствором $KHSO_4$, снова водой и высушивали в вакууме. Затем 2,27 г полученного вещества растворяли в смеси 30 мл метанола и 500 мл этилацетата, к раствору прибавляли при перемешивании раствор 0,4 мл дициклогексиламина в 10 мл этилацетата. Смесь выдерживали 18 ч при 5° С, выпавший осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме над фосфорным ангидридом. Получили 1,3 г (48%) соединения (XV) в форме дициклогексиламмониевой соли с т. пл. $180-182^\circ$ С, R_f 0,33 (В), 0,73 (Г), $[\alpha]_D^{22} +19,0^\circ$ (c 1,0; DMF). Найдено, %: С 60,36; Н 7,44; N 10,32; S 2,26. $C_{57}H_{77}N_9O_5S \cdot C_{12}H_{23}N$. Вычислено, %: С 60,33; Н 7,33; N 10,19; S 2,32. Аминокислотный анализ: Orn 1,0 (1); Thr 2,20 (2); Phe 0,95 (1); Ser 1,10 (1); Cys 1,08 (1).

TFA-H-Trp-Orn(Z)-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys(Thp)-OH (XVI). К раствору 1,1 г (0,8 ммоль) дициклогексиламмониевой соли гептапептида (XV) в смеси 15 мл метанола и 2 мл DMF прибавляли 2 г ионообменной смолы дауэкс-50 W (H^+ -форма), смесь перемешивали 10 мин, фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме и получали 0,9 г (97%) гептапептида (XV) со свободным карбоксилем. К этому соединению прибавляли 15 мл смеси трифторуксусной кислоты с хлористым метилом (1:1), 1 мл анизола, 0,3 мл тиогликолевой кислоты и полученную смесь выдерживали 1 ч при 5° С. Затем реакционную смесь упаривали в вакууме, остаток растирали с эфиром, осадок отделяли фильтрованием и сушили в вакууме. Получили 0,82 г (90%) соединения (XVI) с т. пл. $198-200^\circ$ С.

Boc-Ala-Phe-Phe-OMe (XIX). К охлажденному до -20° С раствору 2,84 г (15 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонилаланина в 30 мл тетрагидрофурана прибавляли 1,65 мл (15 ммоль) *N*-метилморфолина, а затем 2 мл (15 ммоль) бутилхлорформиата. Раствор перемешивали 5 мин при -20° С, прибавляли охлажденный раствор 5,33 г (15 ммоль) хлоридрата метилового эфира фенилаланилфенилаланина [13] и смесь 1,65 мл (15 ммоль) *N*-метилморфолина в 15 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 18 ч при 20° С, выпавший осадок отфильтровывали, промывали DMF и объединенный фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в этилацетате и последовательно промывали 5% раствором $KHSO_4$, насыщенным при 20° С раствором NaCl, 5% раствором $KHCO_3$, снова насыщенным раствором NaCl, после чего этилацетатный раствор высушивали над Na_2SO_4 , упаривали в вакууме и остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетата с петролейным эфиром. Получили 5,8 г (78%) соединения (XIX) с т. пл. $130-131^\circ$ С, R_f 0,62 (А), 0,83 (Г), $[\alpha]_D^{22} -38,0^\circ$ (c 1,0; MeOH). Найдено, %: С 65,25; Н 7,06; N 8,51. $C_{27}H_{35}N_3O_6$. Вычислено, %: С 65,17; Н 7,09; N 8,44.

HCl-H-Ala-Phe-Phe-OMe (XX). 5,5 г (11 ммоль) соединения (XIX) растворяли в 50 мл 10% раствора хлористого водорода в диоксане, смесь выдерживали 45 мин при 20° С, затем упаривали в вакууме и остаток сушили в вакууме над KOH. Получили 4,6 г (98%) соединения (XX).

Boc-Lys(Z)-Ala-Phe-Phe-OMe (XXI). К раствору 4,6 г (10,6 ммоль) соединения (XX) в 25 мл DMF прибавляли 5,33 г (10,6 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира *N*^α-трет-бутилоксикарбонил-*N*^ε-бензилоксикарбониллизина, после чего при перемешивании и охлаждении до -5° С к полученной смеси прибавляли 1,48 мл (10,6 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь выдерживали 18 ч при 5° С, выливали в 500 мл воды со льдом,

(XVI) и 0,3 мл триэтиламина в 9 мл DMF. Смесь выдерживали 1 ч при -15°C и 48 ч при 5°C , после чего выливали в воду со льдом. Образовавшийся осадок отфильтровывали, последовательно промывали водой, 5% раствором KHSO_4 , снова водой и высушивали в вакууме над фосфорным ангидридом. После перекристаллизации из метанола получили 0,65 г (51%) соединения (XXIX) с $[\alpha]_D^{22} -18,0^{\circ}$ (c 0,5; AcOH). Найдено, %: С 57,95; Н 6,64; N 10,78; S 3,02. $\text{C}_{105}\text{H}_{139}\text{N}_{17}\text{O}_{26}\text{S}_2 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$. Вычислено, %: С 58,30; Н 6,60; N 10,98; S 2,93. Аминокислотный анализ: Ala 2,00(2); Gly 1,06(1); Cys 2,01(2); Lys 1,04(1); Phe 3,10(3); Orn 0,92(1); Thr 2,10(2); Ser 0,89(1).

$[\text{Ala}^5, \text{Orn}^9]$ соматостатин (II). 500 мг (0,23 ммоль) соединения (XXIX) растворяли в 20 мл трифторуксусной кислоты, прибавляли 1 мл анизол и 0,5 мл β -меркаптоэтанола, затем через полученный раствор пропускали сухой бромистый водород (40 мин, 20°C). Далее раствор упаривали в вакууме, остаток растворяли в 10 мл DMF и полученный раствор прибавляли к 300 мл эфира. Выпавшее в осадок вещество отфильтровывали и высушивали в вакууме. Для обессоливания полученного трибромгидрата тетрадекапептида (XXX) это вещество растворяли в 4 мл 2 н. уксусной кислоты и раствор вводили в колонку (2,3 \times 110 см) с сефадексом G-25 (fine). Элюировали 2 н. уксусной кислотой, содержащей β -меркаптоэтанол (0,01 экв./л), отбирая фракции по 5 мл (скорость элюции 1,5 мл/мин). Собранные фракции фотометрировали при 278 нм, фракции 41–74 объединяли и лиофилизовали. Полученное вещество (280 мг) растворяли в 2,8 л 0,01 М водного раствора ацетата аммония, доводили pH до 6,8 (0,5 н. водным аммиаком) и полученный раствор выдерживали 72 ч при 4°C . Затем раствор упаривали до 300 мл и подвергали лиофилизации. Полученное вещество растворяли в 1 мл верхней фазы системы (Д). Этот раствор вводили в колонку (2,5 \times 100 см) с сефадексом G-25 (fine), предварительно уравновешенным сначала нижней, а затем верхней фазой указанной системы растворителей. Элюировали верхней фазой этой же системы, отбирая фракции по 5 мл (скорость элюции 0,4 мл/мин). После фотометрирования при 278 нм фракции 46–61, содержащие вещество с R_f 0,36 [14], объединяли и лиофилизовали. Полученное вещество (135 мг) окончательно очищали гель-фильтрацией на колонке (1 \times 110 см) с сефадексом G-25 (fine), применяя в качестве элюента 2 н. уксусную кислоту (скорость элюции 0,25 мл/мин, объем едичичной фракции 3 мл). После фотометрирования и лиофилизации соответствующих фракций получили 25 мг (19%) соединения (II) с R_f 0,16 (Г), 0,30 (Д), 0,58 (Е), 0,69 (Ж); $[\alpha]_D^{24} -49,6^{\circ}$ (c 0,25; 1% AcOH). Аминокислотный анализ: Ala 2,00(2); Gly 1,09(1); Cys 1,75(2); Lys 0,99(1); Phe 2,80(3); Orn 1,01(1); Thr 1,92(2); Ser 0,83(1).

Изучение биологической активности $[\text{Ala}^5, \text{Orn}^9]$ соматостатина (II) на культуре клеток аденогипофиза и поджелудочной железы крыс. Культуру клеток аденогипофиза получали от взрослых самцов крыс массой 180–200 г. Культуру диспергированных панкреатических клеток получали от крысят 1–3-дневного возраста. Методы получения клеточных культур подробно описаны ранее [17, 18]. Островковые клетки поджелудочной железы выращивали на стандартных пластиковых плато Nunc (рабочая концентрация $5 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл среды). Клетки аденогипофиза культивировали в пробирках. Культуры выращивали в виде монослоя в среде 199 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка (Serba) в атмосфере 95% O_2 и 5% CO_2 . В опытах использовали 6-дневные культуры клеток аденогипофиза и 4-дневные культуры островковых клеток.

Секреторную активность клеток аденогипофиза оценивали по количеству освобожденных в среду меченых соматотропина и пролактина. Для этого клетки преинкубировали 17 ч с прибавлением L - ^{14}C лейцина (ЧССР, уд. акт. 40 мкКи/мл). После удаления преинкубационной среды и 4-кратной отмывки от метки с прибавлением избытка немеченого L -лейцина клетки инкубировали в течение 3 ч с соматостатином (I) или его аналогом (II) (2 мкг/мл) в бессывороточной среде 199. Секретируемые

клетками меченые соматотропин и пролактин определяли после электрофоретического разделения среды культивирования в 7,5% полиакриламидном геле с прибавлением в качестве внутреннего свидетеля соматотропина и пролактина экстракта аденогипофизов интактных крыс. В опытах с островковыми клетками соматостатин (I) или его аналог (II) вводили в концентрациях 0,5; 1,0 и 2,0 мкг/мл. Инкубацию клеток с препаратами проводили в течение 30 мин. Содержание в среде инсулина и глюкагона определяли радиоиммунологическим методом, используя для определения инсулина стандартные наборы РИА (ВНР), а для определения глюкагона — стандартные наборы фирмы SPZ (США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R. *Science*, 1973, v. 179, № 4068, p. 77-79.
2. Burgus R., Ling N., Butcher M., Guillemin R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, v. 70, № 3, p. 684-688.
3. Koerker D. J., Ruch W., Chickedel E., Palmer J., Goodner C. J., Ensinnck J., Gale C. C. *Science*, 1974, v. 184, № 4135, p. 482-484.
4. Vale W., Rivier J., Ling N., Brown M. *Metabolism*, 1978, v. 27, № 9, p. 1391-1401.
5. Nutt R. F., Veber D. F., Curley P. E., Saperstein R., Hirschmann R. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1983, v. 21, № 1, p. 66-73.
6. Hirst B. H., Coy D. H. *Regul. Pept.*, 1984, v. 8, № 4, p. 267-271.
7. Rivier J., Brown M., Rivier C., Ling N., Vale W. In: *Peptides/Ed. Loffet A. Bruxelles*, 1976, p. 453-465.
8. Holladay L. A., Puett D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, № 4, p. 1199-1202.
9. Brown M., Rivier J., Vale W. *Endocrinology*, 1976, v. 98, № 2, p. 336-343.
10. Гирин С. К., Швачкин Ю. П. *Журн. общ. химии*, 1978, т. 48, № 4, с. 902-908.
11. Гирин С. К., Швачкин Ю. П. *Журн. общ. химии*, 1978, т. 48, № 8, с. 1887-1891.
12. Гирин С. К., Швачкин Ю. П. *Журн. общ. химии*, 1979, т. 49, № 2, с. 454-457.
13. Швачкин Ю. П., Смирнова А. П., Шишкина А. А., Ермак Н. М., Федотов В. П., Комолов И. С., Морозова Л. Г., Плужникова Г. Н., Садовникова Н. В. *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 2, с. 169-180.
14. Швачкин Ю. П., Гирин С. К., Смирнова А. П., Шишкина А. А., Ермак Н. М. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 2, с. 187-196.
15. Hill R. L., Smith E. L. *J. Biol. Chem.*, 1957, v. 228, № 2, p. 577-585.
16. Rivier J. *Amer. Chem. Soc.*, 1974, v. 96, № 9, p. 2986-2992.
17. Комолов И. С., Морозова Л. Г., Фазекаш И., Феете М., Раппац Д., Федотов В. П. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, 1978, т. 85, № 2, с. 215-217.
18. Федотов В. П., Комолов И. С., Садовникова Н. В., Масленникова В. Г. *Пробл. эндокринологии*, 1978, т. 24, № 4, с. 57-60.

Поступила в редакцию
5.III.1985

NATURAL PEPTIDES AND THEIR ANALOGUES. XXXV. SYNTHESIS AND PROPERTIES OF [Ala⁵, Orn⁹]SOMATOSTATIN

SHVACHKIN Yu. P., SMIRNOVA A. P., ERMAK N. M.,
FEDOTOV V. P., SADOVNIKOVA N. V., PLUZHNIKOVA G. N.

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

A total chemical synthesis of [Ala⁵, Orn⁹]somatostatin has been performed. This structural analogue of natural somatostatin inhibits the release of somatotropin, insulin and glucagon, but shows no inhibitory effect on secretion of prolactin.