



УДК 547.964.4.07:577.17:07

СИНТЕЗ ДВУХ СТРУКТУРНО- И ФУНКЦИОНАЛЬНО-СХОДНЫХ
УЧАСТКОВ АДРЕНОКОРТИКОТРОПИНА И КИНИНА ИЗ ЯДА ОСЫ*Чипенс Г. И., Мутулис Ф. К., Романовский П. Я.,
Крикис А. Ю., Ашманис А. А., Ландо О. Е.**Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Сопоставлением аминокислотных последовательностей адrenoкортикотропина и кинина из яда осы показано структурное сходство этих пептидов: обе молекулы содержат так называемый общий фрагмент, рядом с ним с одной стороны находится минимальный специфически активный центр, а с другой — блок основных аминокислот. Различаются эти соединения противоположным расположением структурных элементов относительно центра молекулы. Для изучения структурно-функциональной организации пептидов синтезированы их производные, содержащие «общий фрагмент» и блок основных аминокислот, т. е. [Lys^{17, 18}]-АСТН(11–18)-NH₂ и кинин(4–12)-пептид. Эти соединения получены классическими приемами пептидной химии с использованием метода пентафторфениловых эфиров. При синтезе фрагмента АСТН применена схема блочной конденсации, а фрагмент кинина осы получен ступенчатым наращиванием пептидной цепи, начиная с С-конца. Синтез пептидов завершён снятием защитных групп каталитическим гидрированием и очисткой полученного продукта ионообменной хроматографией на СМ-целлолозе. Показано, что полученные пептиды обладают сходными биологическими свойствами.

В формальном анализе процесса лиганд-рецепторного взаимодействия обычно выделяют три элемента: «узнавание», комплексообразование и генерирование вторичного, внутриклеточного сигнала. Предполагается, что молекулы пептидно-белковых лигандов имеют определенную структурно-функциональную организацию, обеспечивающую эти элементы взаимодействия, и что различные группировки молекул вносят неодинаковый вклад в осуществление отдельных этапов лиганд-рецепторного взаимодействия [1]. В случае низкомолекулярных пептидов функции отдельных аминокислотных остатков перекрываются (так же как по времени перекрываются отдельные элементы лиганд-рецепторного взаимодействия). Несмотря на то что трудно четко разграничить в пространстве и определить функции отдельных группировок аминокислот или даже целых фрагментов пептидного лиганда в обеспечении трех основных этапов лиганд-рецепторного взаимодействия, работы в области анализа и выявления закономерностей структурно-функциональной организации различных пептидно-белковых лигандов в последнее время бурно развиваются, так как они дают основу для понимания общих принципов пептидно-белковых веществ [2–5].

В результате анализа первичных структур различных по происхождению и функциям биологически активных пептидных гормонов, кининов и других пептидно-белковых биорегуляторов нами выявлены так называемые общие фрагменты, содержащие эквивалентные аминокислотные остатки. Было показано, что эти фрагменты являются функционально активными участками молекул и играют большую роль в обеспечении образования вторичного сигнала, так как их присоединение или удаление из молекулы изменяет специфическую биологическую активность лиганда на три-четыре порядка [1]. Для выяснения функций «общих фрагментов» существенное значение имеет не только сопоставление первичных структур пептидных лигандов, но также анализ общей структурно-функциональной организации молекул в целом и исследование их пространственной структуры. В настоящем сообщении приводится анализ общей структурно-функ-

Сокращения: АСТН — адrenoкортикотропин, DMF — диметилформамид, Nps — *o*-нитрофенилсульфенил-, Psp — пентахлорфенил-, Pfp — пентафторфенил-, Tsp — 2,4,5-трихлорфенил, (сНх)₂NH — диметилдигексилламин.

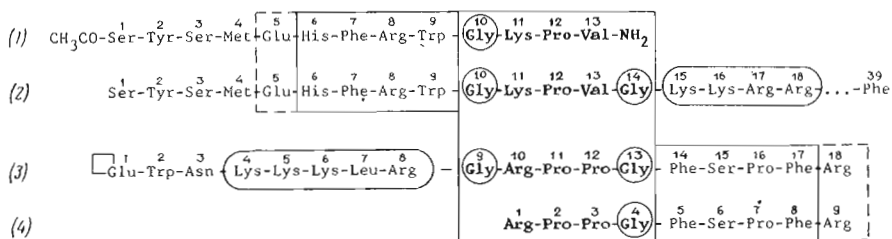


Схема структурной и функциональной организации α -меланотропина (1), адrenoкортикотропина (2), кинина из яда осы (3) и брадикинина (4). В квадратной рамке жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки «общего фрагмента» и приведены последовательности специфического активного центра, в овальной рамке — фрагменты основного характера, кружком обведены остатки глицина, предположительно выполняющие роль шарнира

циональной организации двух весьма различных по происхождению и биологическим функциям пептидов — адrenoкортикотропина (АСТН) и кинина из яда осы.

АСТН является гипофизарным гормоном млекопитающих. Его молекула содержит 39 аминокислотных остатков, однако широкий спектр биологических активностей (стероидогенная, липолитическая, меланотропная, нейротропная и др.) обеспечивается главным образом N-концевой частью молекулы, включающей в себя 18 аминокислотных остатков [6], которую в дальнейшем и будем рассматривать. Кинин из яда осы представляет собой пептид группы брадикинина. Именно это соединение вызывает боль и воспаление при укусе «противника». Молекула кинина осы построена из 18 аминокислотных остатков [7].

Сопоставление первичных структур АСТН(1—18)-пептида и кинина (рисунок) позволяет сделать следующие выводы. Аминокислотные последовательности обоих пептидов включают в себя структуры, характерные также для двух других низкомолекулярных пептидных гормонов: последовательность первых 13 N-концевых аминокислотных остатков АСТН идентична последовательности меланоцитостимулирующего гормона, а девять C-концевых аминокислот кинина осы образуют аминокислотную последовательность брадикинина. Не отличаясь по биологическим свойствам качественно, кинин осы в различных тестах показывает более высокую биологическую активность (в 2—20 раз), чем брадикинин [8]. Причиной этого, по-видимому, является N-концевая аминокислотная последовательность, в которой выделяется блок основных аминокислот (кинин (4—8)), характерный также для адrenoкортикотропина (АСТН(15—18)-пептид). Однако в этом случае кластер основных аминокислот усиливает стероидогенный и липолитический эффект молекулы, снижая ее меланотропную активность [9].

Центральная часть молекул АСТН и кинина осы (а также концевые последовательности α -меланотропина и брадикинина) содержат так называемый общий фрагмент [10]. В случае АСТН и кинина «общий фрагмент», имеющий одинаковое направление ацилирования, заключен между двумя остатками глицина (рисунок), выполняющими, вероятно, роль шарниров.

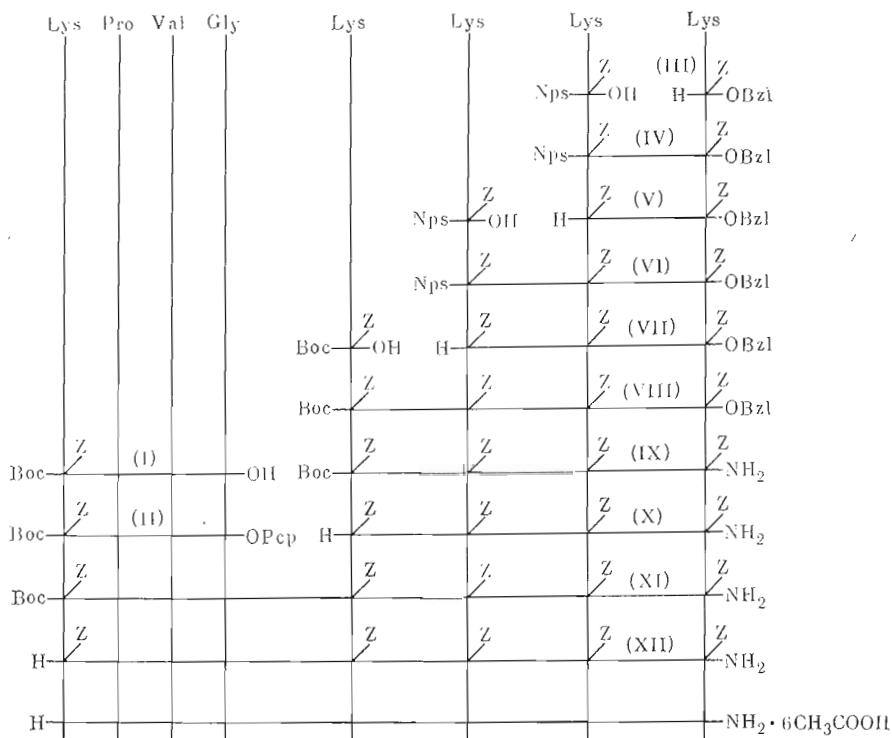
Непосредственно рядом с «общим фрагментом» расположен минимальный специфически активный центр, т. е. минимальный фрагмент природного гормона, который еще сохраняет специфическую для данного соединения биологическую активность. Для АСТН это последовательность His-Phe-Arg-Trp (АСТН(6—9)), для кинина Phe-Ser-Pro-Phe (кинин(14—17)). С другой стороны к общим фрагментам примыкают блоки основных аминокислот. Единственным различием структур АСТН и кинина осы является противоположное расположение этих фрагментов относительно центральной части молекулы — «общего фрагмента». Учитывая, что в ходе эволюции млекопитающие образовались почти на 150 миллионов лет позже насекомых и что эти классы животных находятся на различных ветвях филогенетического дерева [11], можно заключить, что одинаковая струк-

турная организация молекул АСТН и кинина оси подтверждает концепцию биохимической универсальности и имеет существенное функциональное значение в обеспечении специфических биологических эффектов данных пептидных лигандов. Что касается функций упомянутых фрагментов, то, возможно, специфичность действия рассматриваемых соединений обеспечивается различающимися частями молекул, ядро которых составляют минимальные специфически активные части. «Общие фрагменты» также являются функционально активными участками молекулы. Они потенцируют действие специфических частей молекул, по-видимому, двумя путями: действуя непосредственно на клеточные рецепторы или обеспечивая необходимую пространственную структуру специфически активного участка молекулы. Весьма вероятно, что для различных клеточных рецепторов эти функции «общих фрагментов» имеют различный удельный вес. Блок основных аминокислот, вероятно, выполняет «якорные» функции, обеспечивая первичное взаимодействие лиганда с рецептором, правильно его ориентируя на поверхности рецептора и способствуя дополнительному связыванию.

Для экспериментальной проверки вышеизложенных соображений нами предпринят синтез предполагаемых структурных и функциональных эквивалентов молекул адренокортикотропина и кинина оси, т. е. пептидов АСТН (11–18) и кинин (4–12), и исследованы их биологические эффекты. Пептиды АСТН (11–18) и кинин (4–12) содержат «общий фрагмент» и блок основных аминокислот. На этом основании можно было ожидать, что они проявят сходные биологические свойства. Учитывая неспецифичность структур этих фрагментов, можно предположить, что оба они будут действовать как на рецепторы АСТН, например в клетках надпочечников и жировых клетках, так и на рецепторы брадикинина в клетках гладкой мускулатуры. Ответ на наиболее интересный вопрос (будут ли эти фрагменты проявлять эффекты, свойственные их родительским гормонам?) может дать дополнительный материал для оценки функций «общих фрагментов» природных пептидов.

Для упрощения синтеза фрагмент АСТН модифицировал заменой двух остатков аргинина (17 и 18) на остатки *L*-лизина. Известно, что подобная замена существенно не влияет на биологические свойства гормона [12].

Схема 1



Фрагменты природных пептидов получены нами классическими приемами пептидной химии. При синтезе октапептида аденокортикотропина [Lys^{17,18}] АСТН(10–18)-NH₂ (схема 1) полученный по методике [13] тетрапептид (I) реакцией с трихлорацетатом пентафторфенола [14] превратили в соответствующий пентахлорфениловый эфир (II). Другой промежуточный продукт, (X), синтезирован исходя из бензилового эфира N^ε-бензилоксикарбониллизина (III). При этом для наращивания пептидной цепи использованы *o*-нитрофенилсульфенил-N^ε-бензилоксикарбониллизин (получение веществ (IV) и (VI)) и *трет*-бутоксикарбонил-N^ε-бензилоксикарбониллизин (получение соединения (IX)) в виде дициклогексиламмониевых солей и дициклогексилкарбодимид. Промежуточные соединения (IV) и (V) деблокированы хлористым водородом в метаноле, а для удаления *трет*-бутоксикарбонильной группы у соединения (IX) использована водная трифторуксусная кислота. Обработкой бикарбонатом натрия получено соединение (X). Конденсация пептидных блоков (II) и (X) позволила получить защищенный октапептид (XI). Далее воздействие трифторуксусной кислоты, затем бикарбоната натрия привело к частично деблокированному пептиду (XII), который каталитическим гидрированием превращен в целевой [Lys^{17,18}] АСТН(10–18)-NH₂-пептид; очистка последнего осуществлена ионообменной хроматографией на СМ-целлюлозе. Строение продукта доказано аминокислотным анализом.

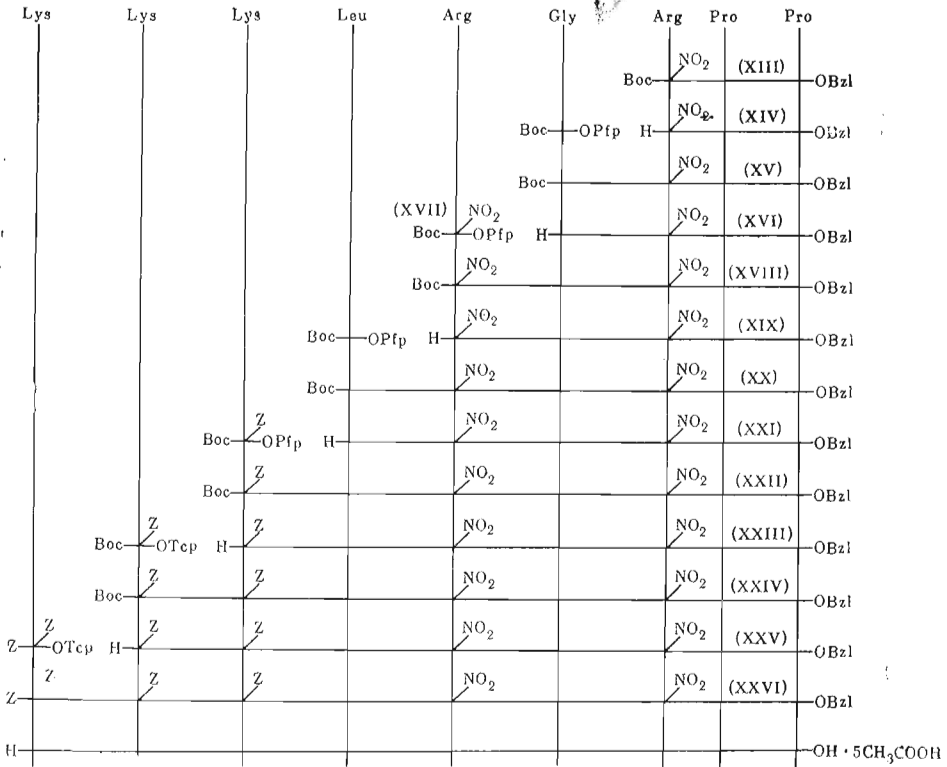
Синтез фрагмента кинина из яда осы (кинин(4–12)-нонапептид, схема 2) проведен ступенчатым наращиванием пептидной цепи с С-конца, исходя из хлоргидрата бензилового эфира пролина. При этом использованы активированные производные *трет*-бутоксикарбониламинокислот, а именно пентафторфениловые эфиры (для получения промежуточных соединений (XV), (XVIII), (XX), (XXII), 2,4,5-трихлорфениловый эфир (получение соединения (XXIV)) и смешанный ангидрид изобутилугольной кислоты (для образования веществ (XIII)). Для защиты боковых функций аргинина и лизина использованы соответственно нитро- и бензилоксикарбонильная группы. Для присоединения N-концевого лизина применен 2,4,5-трихлорфениловый эфир его дибензилоксикарбонильного производного. Процесс образования пептидных связей проведен в диметилформамидном растворе в присутствии N-метилморфолина. Образовавшийся защищенный пептид отделен от непрореагировавших исходных веществ и других продуктов синтеза экстракциями и растиранием с диэтиловым эфиром или этилацетатом. Для отщепления *трет*-бутоксикарбонильной группы использован раствор хлористого водорода в диоксане, а также смесь трифторуксусной кислоты с хлористым метилом (для получения соединений (XXIII) и (XXV)). В конце синтеза все защитные группы удалены каталитическим гидрированием.

На стадиях присоединения *трет*-бутоксикарбонилнитроаргинина наблюдалось образование побочных продуктов. В случае синтеза трипептида (XIV) побочные вещества были отделены препаративной хроматографией на колонке с силикагелем, а при получении пентапептида (XVIII) — растиранием продуктов реакции с этилацетатом. Конечное вещество очищено ионообменной хроматографией, его строение доказано аминокислотным анализом. Для идентификации промежуточных пептидов использованы также спектры ПМР.

Результаты биологических испытаний [Lys^{17,18}] АСТН(11–18)-NH₂- и кинин(4–12)-пептидов подробно описаны в работах [10, 15, 16]. Исследование стероидогенной активности фрагмента аденокортикотропина показало, что он обладает собственным стероидогенным эффектом на изолированных клетках надпочечников крыс (EC₅₀ 2,66·10⁻⁴ мкг/мл, α1)*. Это позволяет предположить, что «общий фрагмент» непосредственно участвует в активации клеточных рецепторов, так как блок основных аминокислот

* EC₅₀ — концентрация препарата, при которой достигается половина максимального эффекта, α — внутренняя активность испытуемого соединения (определяется отпущенном максимальном количестве кортикостерона, образовавшегося при действии исследуемого соединения, к максимальному количеству кортикостерона, образовавшегося при действии АСТН(1–24)).

Схема 2



стероидогенную активность не проявляет. Полученные результаты не согласуются с имеющимися в литературе данными об отсутствии стероидогенной активности у фрагментов 11–18 [17] и 11–24 [18] адренокортикотропина. По-видимому, существенное значение имеет методика приготовления суспензии клеток надпочечников. Нами для этих целей применен фермент коллагеназа, в то время как другие авторы использовали трипсин, который, возможно, частично разрушает рецепторные белки [10]. Интересно, что кинин(4–12)-пептид в концентрациях 100 мкг/мл также проявляет незначительный стероидогенный эффект. Далее было обнаружено, что в концентрациях, где фрагменты АСТН и кинина собственным стероидогенным эффектом не обладают, они значительно (в 2–3 раза) потенцируют стероидогенный эффект АСТН(1–24)-пептида.

Исследование липолитической активности пептидов [Lys^{17, 18}]-АСТН(11–18)-NH₂ и кинин(4–12) на изолированных жировых клетках крысы показало, что в районе концентраций 1–1000 мкг/кг они собственной липолитической активности не проявляют, однако, внесенные в инкубационную среду за 15 мин до АСТН(1–24)-пептида, вызывают значительное потенцирование эффекта гормона, не превышающее при этом его максимального значения.

Фрагменты [Lys^{17, 18}]-АСТН(11–18)-NH₂ и кинин(4–12) обнаруживают сходные свойства также при действии на рецепторы брадикинина, расположенные в клетках *Neum* морской свинки. Оба соединения являются антагонистами брадикинина и имеют значения pA_2^* 5,63±0,44 и 5,59±0,58.

Полученные результаты подтверждают вышеизложенные предположения о сходстве структурно-функциональной организации адренокортикотропина и кинина опы на уровне первичных структур. Ряд фактов свидетельствует, что такое сходство имеет место также на уровне пространственной структуры [4, 10]. Доказательства этому даст изучение аналогов адренокортикотропина и кинина с закрепленной (циклической) пространственной структурой.

* pA_2 — отрицательный логарифм концентрации антагониста, которая уменьшает эффект двойной дозы брадикинина до эффекта одной дозы.

Экспериментальная часть

Для синтеза использованы производные аминокислот, поставляемые фирмой «Reanal» (Венгрия). Упаривание проводили на вакуумном испарителе при 30° С. Температуры плавления, которые определяли в открытых капиллярах, приведены без исправления. Индивидуальность полученных соединений проверяли с помощью ТСХ на пластинках «Silufol UV 254» или «Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60F₂₅₄». Приведены хроматографические подвижности на сидуфоле в системах: хлороформ — этанол — этилацетат — уксусная кислота — вода, 85 : 5 : 8 : 2 : 0,25 (А), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 85 : 10 : 5 (Б), хлороформ — этанол — *n*-бутанол — этилацетат — вода, 10 : 6 : 4 : 3 : 1 (В), хлороформ — этанол — вода, 40 : 47 : 5 (Г), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Д), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5, верхняя фаза (Е), пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 20 : 30 : 6 : 24 (Ж). Электрофорез осуществляли на бумаге FN-16 (ГДР) в 1 н. (З) и 5 н. (И) уксусной кислоте или на бумаге Whatman 3ММ в 7% муравьиной кислоте (К). Приведена подвижность относительно гистидина. Вещества обнаруживали в УФ-свете, а также с помощью нингидрина, выдерживания в парах иода, реагента Сакагучи [19] или хлор-бензидина [20]. Спектры ПМР получали на приборе «Perkin-Elmer R12A». Аминокислотный анализ выполнен на анализаторе «Bioscal BC-200» после 24-часового гидролиза пептидов в запаянной ампуле при 110° С.

Элементный анализ (С, Н, N) соединений (III), (IV), (VI), (VIII), (IX), (XI), (XXVI), (XXI) удовлетворительно совпал с теоретическим.

Voc-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-OPcp (II). К охлажденному до -15° С раствору 0,89 г (1,4 ммоль) *Voc-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-OH (I)* [13] в 2 мл DMF добавляли 0,193 мл (1,4 ммоль) триэтиламина и 0,57 г (1,4 ммоль) пентахлорфенилового эфира трихлоруксусной кислоты [14]. Через 70 мин к реакционной смеси добавляли 20 мл воды, выпавший осадок промывали водой, отфильтровывали и высушивали. Полученный продукт промывали последовательно 20 мл метанола и 20 мл эфира. Выход эфира (II) 0,49 г (40%). Т. пл. 188—193° С (ср. 188—190° С [21]).

TosOH·H-Lys(Z)-OBzl (III). К раствору 20,6 мл (0,20 моль) бензильного спирта в 75 мл бензола добавляли 2,36 г (12,4 ммоль) моногидрата *n*-толуолсульфокислоты и 2,80 г (10 ммоль) *H-Lys(Z)-OH*. Смесь кипятили 12 ч на водяной бане с азеотропной отгонкой воды через насадку Дина-Старка. Затем реакционную смесь упаривали, к остатку добавляли 200 мл эфира, выдерживали 2 ч при 0° С и фильтровали. Выход 4,19 г (77%). Т. пл. 117—121° С; $[\alpha]_D^{22}$ -4,3° (с 1, DMF). R_f 0,69 (Е), 0,35 (А); E_{vis} 0,67 (И).

Nps-Lys(Z)-Lys(Z)-OBzl (IV). К 2,71 г (5,0 ммоль) соединения (III) добавляли 3,26 г (5,3 ммоль) *Nps-Lys(Z)-OH·HN(cHx)₂* в 50 мл хлороформа и перемешивали до полного растворения осадка. Раствор охлаждали до -10° С и добавляли 1,07 г (5,22 ммоль) дициклогексилкарбодимид, перемешивали 30 мин при этой температуре и оставляли на 20 ч при 20° С. Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 200 мл этилацетата и промывали 5% NaHCO₃ (3×80 мл), водой, 10% KHSO₄ (3×80 мл) и снова водой. Органический раствор высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали. Остаток кристаллизовали из смеси эфир — петролейный эфир. Выход 3,67 г (93%). Т. пл. 131—133° С; $[\alpha]_D^{22}$ -14,5° (с 1; DMF). R_f 0,91 (Е), 0,98 (Б).

HCl·H-Lys(Z)-Lys(Z)-OBzl (V). К раствору 2,16 г (3,77 ммоль) соединения (IV) в смеси 60 мл хлористого метилена и 10 мл метанола добавляли 2,55 мл 1,49 М HCl в метаноле. Реакционную смесь выдерживали 30 мин при 20° С и упаривали. Маслообразный остаток обрабатывали эфиром и петролейным эфиром, закристаллизовавшийся продукт отфильтровывали и высушивали в эквенкаторе. Выход 2,49 г (95%). Т. пл. 128—132° С; $[\alpha]_D^{22}$ -1,3° (с 1; DMF). R_f 0,64 (Г).

Nps-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-OBzl (VI) получали, как описано для пептида (IV), из 2,31 г (3,46 ммоль) соединения (V) и 2,26 г (3,68 ммоль) *Nps-*

Lys(Z)-OH·HN(cHx)₂. Кристаллизовали из смеси эфир – петролейный эфир. Выход 3,45 (95%). Т. пл. 122–124° С. R_f 0,8 (Д).

HCl·H-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-OBzl (VII) получали из 3,36 г (3,21 ммоль) соединения (VI) и 3,1 мл 1,04 М HCl в метаноле, как описано для хлоргидрата (V). Выход 2,85 г (95%). Т. пл. 161–165° С. R_f 0,29 (Д) 0,51 (Б).

Вос-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-OBzl (VIII). К 2,78 г (2,98 ммоль) хлоргидрата (VII) добавляли 3,51 г (6,26 ммоль) Вос-Lys(Z)-OH·HN(cHx)₂ и 50 мл диметилформамида и перемешивали до полного растворения веществ. Раствор охлаждали до –10° С и добавляли 12,5 мл 0,5 М раствора дициклогексилкарбодимиды в хлористом метиле. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при –10° С и 24 ч при 20° С. Выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали, к фильтрату добавляли 300 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и растворяли в 30 мл этанола. К раствору добавляли 150 мл воды, выпавший продукт отфильтровывали и высушивали. Выход 2,53 г (67,5%). Т. пл. 146–154° С; [α]_D²² –12,6° (с 1; DMF). R_f 0,86 (Б).

Вос-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-NH₂ (IX). Раствор 2,45 г (1,95 ммоль) соединения (VIII) в 30 мл DMF и 70 мл метанола насыщали 30 мин при 20° С аммиаком. Реакционную смесь выдерживали 72 ч при 20° С, метанол упаривали. К остатку добавляли 220 мл воды, суспензию выдерживали 1 ч при 4° С, выпавший осадок отфильтровывали. Выход 2,12 г (93%). Т. пл. 181–183° С, [α]_D²² –10,3° (с 1; DMF). R_f 0,75 (Б).

H-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-NH₂ (X). 2,0 г (1,77 ммоль) соединения (IX) растворяли в 20 мл 70% трифторуксусной кислоты, реакционную смесь выдерживали 2 ч при 20° С и выливали в 70 мл 50% раствора K₂CO₃. Выпавший осадок отфильтровывали и на фильтре промывали водой до нейтральной реакции фильтрата. Вещество на фильтре растворяли в 17 мл DMF, фильтровали, фильтрат добавляли к 150 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровывали. Выход 1,57 г (86%). Т. пл. 213–215° С с разл.; [α]_D²² –1,0° (с 1,5; DMF). R_f 0,64 (Б).

Вос-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-NH₂ (XI). К суспензии 0,53 г (0,5 ммоль) соединения (X) в 3,5 мл DMF добавляли 0,44 г (0,5 ммоль) Ср-эфира (II) и реакционную смесь нагревали при ~90° С до полного растворения. Через 24 ч смесь выливали в 100 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали и на фильтре промывали 5% NaHCO₃ и водой. Выход 0,74 г (88%). Т. пл. 180–183° С с разл. R_f 0,91 (Г).

H-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-NH₂ (XII). 1,44 г (0,9 ммоль) соединения (XI) растворяли в 20 мл 70% трифторуксусной кислоты и выдерживали 90 мин при 20° С. Реакционную смесь выливали в 40 мл 5% NaHCO₃, выпавший осадок отфильтровывали и промывали водой. Выход 1,24 г (92%). R_f 0,62 (Г); E_{nis} 0,0 (И).

(H-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂)·6CH₃COOH ([Lys^{17, 18}]. АСТН(10–18)). К суспензии 0,79 г (0,5 ммоль) соединения (XII) в 40 мл 90% уксусной кислоты добавляли Pd-чернь и гидрировали 48 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученный продукт очищали хроматографически на колонке с СМ-целлюлозой (колонка 2×10 см) в градиенте ацетата аммония (0,01 М, рН 4,5→0,3 М, рН 6,8; 2,0 л). Фракции, содержащие чистое вещество, объединяли и лиофилизировали. Выход 0,44 г (70%). E_{nis} 1,27 (И), 1,26 (К). Аминнокислотный анализ: Lys 5,13 (5), Pro 1,42 (1), Val 0,82 (1), Gly 1,00 (1).

Вос-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XIII) получали согласно методике [22], за исключением того, что пептид (XIII) очищали хроматографией на колонке с силикагелем, используя в качестве элюента хроматографическую систему А. Выход 52%. R_f 0,24 (А), 0,94 (В), 0,65 (Е), 0,88 (Г), 0,65 (Ж).

HCl·H-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XIV). 6,04 г (10 ммоль) соединения (XIII) растворяли в 30 мл безводного диоксана, добавляли 10 мл насыщенного раствора безводного HCl в диоксане. Через 30 мин (контроль ТСХ, система В, УФ-индикация) к реакционной смеси добавляли 100 мл безводного этилацетата. Образовавшийся осадок соскабливали со стенок

и массу перемешивали на магнитной мешалке до образования однородной суспензии. Фильтровали, полученное кристаллическое вещество выдерживали в вакуумном эксикаторе над КОН. Выход 5,18 г (96%); E_{HIS} 0,62 (З).

Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XV). 5,0 г (9,26 ммоль) соединения (XIV) растворяли в 30 мл DMF, добавляли N-метилморфолин до pH 8 и 3,79 г (11,1 ммоль) Boc-Gly-OPfp [23]. Через 20 мин (контроль ТСХ, система В, УФ-индикация) упаривали растворитель, остаток растворяли в смеси хлороформа и 10% KHSO₄ (по 50 мл), отделяли хлороформный слой, промывали 50 мл воды, сушили безводным MgSO₄, фильтровали, фильтрат упаривали, остаток растирали с эфиром, затем перемешивали на магнитной мешалке до образования однородной суспензии. Фильтровали, осадок на фильтре промывали эфиром. Выход 5,84 г (95%). R_f 0,08 (А), 0,59 (В), 0,65 (Е), 0,89 (Г), 0,76 (Ж).

HCl-H-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XVI) получали из соединения (XV) аналогично синтезу соединения (XIV). Выход 96%. R_f 0,20 (Е), 0,34 (Г), 0,53 (Ж); E_{HIS} 0,60 (З).

Boc-Arg(NO₂)-OPfp (XVII). 11,2 г (30 ммоль) Boc-Arg(NO₂)-OH· $\frac{3}{4}$ N₄furan суспендировали в 500 мл безводного этилацетата, добавляли 5,52 г (30 ммоль) пентафторфенола, охлаждали до 0° С и вводили 6,19 г (30 ммоль) дициклогексилкарбодимид. Затем перемешивали 10 ч при 0°, фильтровали, осадок на фильтре промывали 200 мл безводного этилацетата, фильтрат упаривали, остаток растирали с безводным эфиром, фильтровали, осадок сушили в эксикаторе над КОН и P₂O₅. Вес продукта 13,1 г, содержание соединения (XVII) в нем ~80% (ТСХ). Этот препарат без очистки использовали в дальнейшем синтезе.

Boc-Arg(NO₂)-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XVIII) получали из соединений (XVI) и (XVII) аналогично синтезу соединения (XV), за исключением того, что продукт, содержащий соединение (XVII), применяли в 1,5-кратном избытке, а полученный в синтезе осадок, содержащий соединение (XVIII), тщательно промывали этилацетатом. Выход 93%. $[\alpha]_D^{20}$ -58,3° (с 1,15; DMF). R_f 0 (А), 0,42 (В), 0,56 (Е), 0,86 (Г), 0,71 (Ж). Спектр ПМР (δ, м.д.): 1,40 ((CH₃)₃C, с), 1,4-2,3 (β, γ-CH₂(Arg), β, γ-CH₂(Pro)), 2,7-5,0 (α-CH, δ-CH₂(Arg), α-CH₂(Gly), α-CH, δ-CH₂(Pro)); 5,08 (CH₂O, с), 6,74 (NH(Boc), д, J 6,5 Гц), 7,32 (C₆H₅, с), 7,0-9,0 (NH·(Arg, Gly)).

HCl-H-Arg(NO₂)-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XIX) получали из соединения (XIX) и Boc-Leu-OPfp [24] аналогично синтезу соединения (XV). 0,17 (Е), 0,29 (Г), 0,53 (Ж); E_{HIS} 0,52 (З).

Boc-Leu-Arg(NO₂)-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XX) получали из соединения (XIX) и Boc-Leu-OPfp [23] аналогично синтезу соединения (XV). Выход 88%. $[\alpha]_D^0$ -59,0° (с 1,11; DMF). R_f 0 (А), 0,48 (В), 0,62 (Е), 0,88 (Г), 0,75 (Ж).

HCl-H-Leu-Arg(NO₂)-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XXI) получали из соединения (XX) аналогично синтезу соединения (XIV). Выход 93,5%. R_f 0,27 (Е), 0,48 (Г), 0,57 (Ж); E_{HIS} 0,49 (З).

Boc-Lys(Z)-Leu-Arg(NO₂)-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XXII) получали из соединения (XXI) и Boc-Lys(Z)-OPfp аналогично синтезу соединения (XV). Выход 82%. $[\alpha]_D^{20}$ -51,7° (с 1,11; DMF). R_f 0 (А), 0,57 (В), 0,67 (Е), 0,91 (Г), 0,78 (Ж).

CF₃COOH·H-Lys(Z)-Leu-Arg(NO₂)-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XXIII). 0,72 г (0,58 ммоль) соединения (XXII) растворяли в 6 мл смеси трифторуксусная кислота - хлористый метилец (1:1) и выдерживали при 20° С. Через 20 мин (контроль ТСХ, система В, УФ-индикация) реакционную смесь упаривали при 0° С, остаток растирали с безводным эфиром, фильтровали, полученное кристаллическое вещество выдерживали в вакуумном эксикаторе над КОН. Выход 0,71 г (98%). R_f 0,51 (Е), 0,66 (Г), 0,70 (Ж); E_{HIS} 0,42 (З).

Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-Arg(NO₂)-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Pro-OBzl (XXIV) получали из соединения (XXIII) и Boc-Lys(Z)-OTcp [24] аналогично синтезу соединения (XV), однако активированный эфир применялся

в 1,5-кратном избытке и время реакции было 20 ч. Выход 91%. $[\alpha]_D^{20}$ $-44,1^\circ$ (*c* 1,32; DMF). R_f 0 (A), 0,68 (Ж), 0,71 (E), 0,90 (Г), 0,80 (Ж).

$CF_3COOH \cdot H-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-Arg(NO_2)-Gly-Arg(NO_2)-Pro-Pro-OBzl$ (XXV) получали из соединения (XXIV) аналогично синтезу соединения (XXIII). Выход 91%. R_f 0,56 (E), 0,73 (Г), 0,70 (Ж); E_{HIS} 0,30 (З).

$Z-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-Arg(NO_2)-Gly-Arg(NO_2)-Pro-Pro-OBzl$ (XXVI) получали из соединения (XXV) аналогично синтезу соединения (XXIV). Выход 84%. $[\alpha]_D^{20}$ $-40,0^\circ$ (*c* 1; DMF). R_f 0,82 (E), 0,92 (Г), 0,82 (Ж).

$5CH_3COOH \cdot H-Lys-Lys-Lys-Leu-Arg-Gly-Arg-Pro-Pro-OH$ (кинин(4-12)). К раствору 0,35 г (0,19 ммоль) соединения (XXVI) в 20 мл ледяной уксусной кислоты добавляли Pd-чернь и гидрировали 30 ч. Затем отфильтровывали катализатор, фильтрат упаривали, остаток наносили на колоночку (2×10 см) с СМ-целлюлозой и элюировали раствором ацетата аммония (градиент 0,02 М, pH 4,5→0,2 М, pH 7,0; 2,0 л). Фракцию элюата, содержащую чистый пептид, несколько раз лиофилизировали из воды. Выход 162 г (62%). $[\alpha]_D^{23}$ $-73,6^\circ$ (*c* 0,43; вода), R_f 0 (E), 0,10 (Ж); F_{HIS} 1,28 (З). Аминнокислотный анализ: Lys 2,81 (З), Leu 0,88 (1), Arg 2,33 (2), Gly 1,00 (1), Pro 2,00 (2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Chipens G. I., Krikis A. J., Polevaja L. K. In: Biophysical and biochemical information transfer in recognition / Eds Vassileva-Popova J. G., Jensen E. V. New York — London: Plenum Press, 1979, p. 23–48.
2. Schwyzer R. J. *Mond. Pharm.*, 1968, v. 11, № 3, p. 254–264.
3. Pechter O., Braun Th. In: Structure-activity relationships of protein and polypeptide hormones. Proc. Int. Symp. 2nd 1971 / Eds Margoulies M., Greenwood F. C. *Excerpta Med.*, Amsterdam, Netherland, 1972, p. 212–227.
4. Eberle A., Schwyzer R. *Helv. chim. acta*, 1975, v. 58, № 6, p. 1528–1535.
5. Schwyzer R., Eberle A. *Front. Hormone Res.*, 1977, v. 4, № 1, p. 18–25.
6. Otsuka H., Inoue K. *Pharmac. Therap. B.*, 1975, v. 1, № 3, p. 501–527.
7. Stewart J. M. In: Bradykinin, kallidin and kallikrein / Ed. Erdös E. G. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1979, p. 227–285.
8. Stewart J. M. *Fed. Proc.*, 1968, v. 27, № 2, p. 534–539.
9. Шрёдер Э., Любке К. Пептиды. М.: Мир, 1969, т. 2, с. 259–325.
10. Chipens G. I., Krikis A. J., Romanovski P. J., Nikiforovich G. V., Mutulis F. K., Porunkевич E. A., Klusha V. E. In: Biophysical and biochemical information transfer in recognition / Eds Vassileva Popova J. G., Jensen E. V. New York — London: Plenum Press, 1979, p. 1–22.
11. Кальвин М. Химическая эволюция. М.: Мир, 1971, с. 18–28.
12. Riniker B., Rüttel W. *Helv. chim. acta*, 1970, v. 53, № 3, p. 513–519.
13. Крикис А. Ю., Романовский П. Я., Чипенс Г. И. Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1976, вып. 3, с. 316–321.
14. Кублиц Г. Г., Натанак Чх. *Chem. Pharm. Bull.*, 1968, v. 16, № 5, p. 929–932.
15. Порункевич Е. А., Кублиц Г. Г., Скуиньш А. А., Чипенс Г. И. Биохимия, 1977, т. 42, № 2, с. 267–273.
16. Кублиц Г. Г., Порункевич Е. А., Скуиньш А. А., Макарова Н. А., Мисиньш И. П., Клуша В. Е., Чипенс Г. И. Биохимия, 1977, т. 42, № 4, с. 616–621.
17. Nakamura M. J. *Biochem.* 1972, v. 71, № 6, p. 1029–1041.
18. Hofmann K., Wingender W., Finn F. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, v. 67, № 2, p. 829–836.
19. Sakaguchi S. J. *Biochem.*, 1950, v. 37, № 2, p. 231–236.
20. Reindel F., Hoppe W. *Naturwiss.*, 1953, v. 40, № 7, p. 221.
21. Fujino M., Nishimura O., Hatanaka C. *Chem. Pharm. Bull.*, 1969, v. 17, № 10, p. 2135–2141.
22. Везнер Р. Э., Чипенс Г. И., Дунав И. В. Химия природн. соедин., 1973, вып. 6, с. 763–768.
23. Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I. *Lieb. Ann.*, 1973, № 9, p. 1421–1429.
24. Broadbent W., Morley J. S., Stone B. E. *J. Chem. Soc. C*, 1967, № 24, p. 2632–2636.

Поступила в редакцию
28.X.1981

**SYNTHESIS OF TWO STRUCTURALLY AND FUNCTIONALLY ANALOGOUS
REGIONS OF ADRENOCORTICOTROPIN AND WASP VENOM KININ**

**CHIPENS G. I., MUTULIS F. K., ROMANOVSKY P. Ya.,
KRIKIS A. Yu., ASMANIS A. A., LANDO O. E.**

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the
Latvian SSR, Riga*

Structural similarity of two natural peptides – adrenocorticotropin and polysteskinin, a kinin from the wasp venom, has been demonstrated. The title molecules contain a so-called common fragment flanked on the one side by the minimal specifically active center and, on the other, by a block of four basic amino acid residues. Fragments of ACTH and polysteskinin were synthesized which contain the «common fragment» and a block of basic amino acids, [Lys^{17, 18}]ACTH (11-18) and kinin (4-12). The former peptide was obtained according to 4-4 scheme, the latter by stepwise elongation of peptide chain from the C-end using the method of pentafluorophenyl esters. It was found that the two synthetic peptides exert similar biological effects.