



УДК 577.112.6+539.16:547.292

ПОЛУЧЕНИЕ [ $^{14}\text{C}$ -АЦЕТИЛ]-ФРАГМЕНТА (4—7)  
АДРЕНКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНА*Максимова Л. А., Петренко Б. В., Незавибатько В. Н.,  
Пономарева-Степная М. А., Мясоедов Н. Ф.**Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва*

Описано получение  $^{14}\text{C}$ -ацетилированного фрагмента АСТН $_{4-7}$  с мольной активностью 5,47 Ки/моль с помощью 4-нитрофенил- [ $^{14}\text{C}$ ]ацетата.

Применение радиоактивных препаратов — один из непосредственных способов исследования механизма действия низкомолекулярных биорегуляторов. В подобных исследованиях энкефалина [1], фрагмента (4—9) адренкортикотропного гормона (АСТН $_{4-9}$ ) [2], кортикотропина [3] и других применялись изотопы  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ . В тех случаях, когда это не искажает результатов физиологических испытаний, весьма удобным методом мечения пептидов является введение ацетильной группы, меченной различными изотопами ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ).

Известен метод введения ацетильной группы, меченной тритием, по алифатической аминогруппе пептида с помощью 4-нитрофенил- [ $^3\text{H}$ ]ацетата [4]. Мы использовали этот метод для введения меченной  $^{14}\text{C}$  ацетильной группы во фрагмент АСТН $_{4-7}$ , влияющий на поведенческую активность животных [5]. Контрольные опыты поведенческих реакций животных при инъекции внутривенно Ас-АСТН $_{4-7}$  показали, что в тестах обучения крыс в лабиринте с пищевым подкреплением результаты аналогичны инъекции АСТН $_{4-7}$  без ацетильной группы [6] \*.

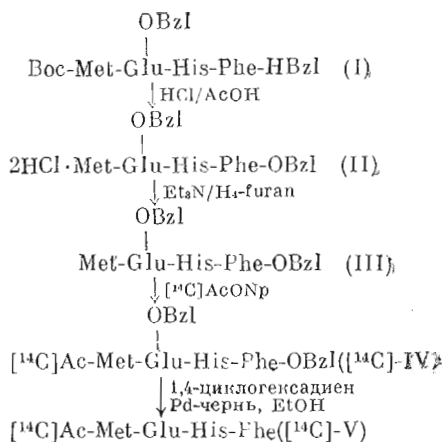
Введение радиоактивной ацетильной группы осуществили реакцией с использованием 4-нитрофенил- [ $^{14}\text{C}$ ]ацетата (схема), который получали из меченой уксусной кислоты добавлением дициклогексилкарбодимида и нитрофенола. Получено чистое вещество с удовлетворительным выходом. Отсутствие побочных продуктов обеспечивает возможность четкого контроля за ходом реакции, что особенно важно при работе с радиоактивными препаратами. Аналогичную схему можно рекомендовать для получения пептидов, меченных изотопами  $^{13}\text{C}$  и  $^3\text{H}$ . Немаловажным достоинством методики является доступность меченной различными изотопами уксусной кислоты, в том числе с высокой удельной радиоактивностью.

## Экспериментальная часть

Защищенный фрагмент АСТН $_{4-7}$  Boc-Met-Glu(OBzl)-His-Phe-OBzl (I) слягезирован как описано ранее [7]. В работе использовали [ $^{14}\text{C}$ ]уксусную кислоту отечественного производства с радиоактивностью 5,5 Ки/моль; 4-нитрофенол (х.ч.), перекристаллизованный из горячей воды (т. пл.  $114^\circ\text{C}$ ); 4-нитрофенилацетат (ч.д.а.), перекристаллизованный из водного спирта (т. пл.  $78-81^\circ\text{C}$ ).

Температуру плавления синтезированных соединений определяли в открытом капилляре (приведена без поправок). Хроматографический контроль осуществляли на пластинках «Silufol 254» (ЧССР) в системах: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 2 (А), хлороформ — метанол, 10 : 1 (Б), хлороформ — метанол — конц.  $\text{NH}_3$ , 10 : 5 : 1 (В), изопропанол —

\* Авторы выражают благодарность А. А. Каменскому за проведение опытов по определению физиологической активности.



$\text{H}_4\text{-furan}$  — тетрагидрофуран,

$[^{14}\text{C}]\text{AcONp}$  — 4-нитрофенил- $[^{14}\text{C}]$ ацетат.

Использованные в пептиде аминокислоты — *L*-конфигурации.

вода — муравьиная кислота, 20 : 5 : 1 (Г). Пептиды (I)–(IV), ( $[^{14}\text{C}]\text{-IV}$ ) обнаруживали на хроматограммах в парах иода, пептиды (V) и ( $[^{14}\text{C}]\text{-V}$ ) — реактивом на гистидиновый остаток раствором диазо-1-*H*-тетразола в воде, который готовили непосредственно перед употреблением по методу [8] из 5-амино-1-*H*-тетразола \*. Методика обнаружения заключалась в предварительной обработке хроматограмм парами аммиака для контроля на отсутствие 4-нитрофенола и 4-нитрофенилацетата. Затем опрыскивали свежереприготовленным 2% раствором диазо-1-*H*-тетразола в воде, подсушивали и обрабатывали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ . После высушивания хроматограмм при  $\sim 100^\circ\text{C}$  пептиды (V) и ( $[^{14}\text{C}]\text{-V}$ ) обнаруживали по появлению желто-оранжевой окраски.

Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике для регистрации  $\beta$ -излучения РЖС-20А (СССР) с эффективностью регистрации 80% в диоксановом сцинтилляторе, приготовленном по методике [9], путем просчета элюата зон пластинок ТСХ (профиль радиоактивности).

*4-Нитрофенил- $[^{14}\text{C}]$ ацетат*. К раствору 14,5 мг (0,104 ммоль) нитрофенола в 1 мл тетрагидрофурана добавляли 10 мкл (0,150 ммоль)  $[^{14}\text{C}]$ -уксусной кислоты в 1 мл тетрагидрофурана и двумя порциями 42,2 мг (0,204 ммоль) дициклогексилкарбодимида в 1 мл тетрагидрофурана, выдерживали в темноте при  $\sim 20^\circ\text{C}$ . Контроль за ходом реакции осуществляли ТСХ с обнаруженным продуктом в парах  $\text{NH}_3$ . Для 4-нитрофенола  $R_f$  0,86 (А), 0,30 (Б), 0,76 (В). Для 4-нитрофенил- $[^{14}\text{C}]$ ацетата  $R_f$  0,78 (А), 0,93 (Б), 0,90 (В).

После окончания реакции (7 сут) осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха. По данным ТСХ (обработка пластинок аммиаком) и снятию профиля радиоактивности, продукт реакции индивидуален. Выход  $\sim 100\%$  (считая на 4-нитрофенол).

*2HCl · Met-Glu(OBzl)-His-Phe-OBzl (II)*. К 18 мг (0,021 ммоль) пептида (I) добавляли 0,2 мл 1 н.  $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$  и выдерживали 0,5 ч при  $20^\circ\text{C}$ . Затем добавляли абсолютный эфир и отделившийся осадок промывали несколько раз эфиром. Продукт высушивали в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$  и  $\text{NaOH}$ .  $R_f$  0,01 (А), 0,27 (Г). Выход 17,2 мг ( $\sim 100\%$ ).

*$[^{14}\text{C}]\text{Ac-Met-Glu(OBzl)-His-Phe-OBzl}$  ( $[^{14}\text{C}]\text{-IV}$ ) и (IV)*. К 17,2 мг (0,021 ммоль) тетрапептида (II) добавляли 4,2 мг (0,042 ммоль) триэтиламина в 1 мл тетрагидрофурана, реакционную смесь отфильтровывали через мелкий фильтр и упаривали досуха. Остаток, пептид *Met-Glu(OBzl)-His-Phe-OBzl* (III), растворяли в 1 мл тетрагидрофурана, добавляли к раствору  $\sim 0,104$  ммоль 4-нитрофенил- $[^{14}\text{C}]$ ацетата в 1 мл тетрагидрофурана и выдерживали 8 сут в темноте при  $\sim 20^\circ\text{C}$ .

По хроматографическому контролю обнаружено три продукта: 4-нитро-

\* Пептиды (I)–(IV), ( $[^{14}\text{C}]\text{-IV}$ ) не обнаруживаются этим реактивом, вероятно, из-за стерических затруднений, вызванных присутствием OBzl-групп.

Фенол ( $R_f$  0,86 (А), 0,30 (Б)), 4-нитрофенил- $[^{14}\text{C}]$ ацетат ( $R_f$  0,78 (А), 0,93 (Б)) и пептид ( $[^{14}\text{C}]$ -IV) ( $R_f$  0,37 (А), 0,01 (Б)).

Определение профиля радиоактивности выявило наличие двух радиоактивных продуктов: 4-нитрофенил- $[^{14}\text{C}]$ ацетата и пептида ( $[^{14}\text{C}]$ -IV).

Раствор упаривали досуха, растворяли в 2 мл воды и тщательно экстрагировали эфиром (5×10 мл). Водный слой, содержащий целевой продукт ( $[^{14}\text{C}]$ -IV), упаривали досуха, добавляли несколько раз сухой метанол. Выход 85%.

По аналогичной схеме из 4-нитрофенилацетата и тетрапептида (III) синтезировали немеченый пептид (IV).  $R_f$  0,37 (А), 0,81 (Б). Т. пл. 152–153° С (метанол+эфир). Выход 85%.

Меченый пептид ( $[^{14}\text{C}]$ -IV) хроматографически и радиохимически однороден и идентичен немеченому препарату (IV).

$[^{14}\text{C}]$ Ac-Met-Glu-His-Phe ( $[^{14}\text{C}]$ -V) и (V). Сухой остаток пептида ( $[^{14}\text{C}]$ -IV) растворяли в 1 мл абс. этанола, добавляли 7 мг Pd-черни, 1 мл 1,4-циклогексадиена и 2 ч кипятили. Раствор фильтровали и упаривали досуха. Выход ( $[^{14}\text{C}]$ -V) 7,1 мг (57% в расчете на пептид (I)). Молярная радиоактивность 5,47 Ки/моль.

Аналогично восстановлением тетрапептида (IV) получили немеченый пептид Ac-Met-Glu-His-Phe (V).  $R_f$  0,26 (А), 0,28 (Б). Т. пл. 216° С (метанол + эфир). Выход 60%.

Меченый пептид ( $[^{14}\text{C}]$ -V) хроматографически и радиохимически однороден и идентичен немеченому препарату (V).

В 20% растворе этанол-вода при ~0° С авторадииолиз пептида ( $[^{14}\text{C}]$ -V) незначителен в течение ~2 мес.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Miller R. J., Kwen-Jen Chang, Leighton J., Cuatrecasas P. Life Sci, 1978, v. 22, № 5, p. 379–388.
2. Verhoef J., Witter A., de Wied D. Brain Res., 1977, v. 131, № 1, p. 117–128.
3. Allen M. C., Brundish D. E., Wade R. J. Chem. Soc. Perkin I, 1979, № 8, p. 2057–2062.
4. Patentschrift 108742 (DDR) 1974.
5. Ашмарин И. П. Ж. эвол. биохим. и физиол., 1977, т. 13, № 5, с. 570–577.
6. Ашмарин И. П., Антонова Л. В., Тигоев С. А., Максимова Л. А., Каменский А. А. Ж. высш. нервн. деят-сти, 1980, т. 30, вып. 6, с. 1196–1203.
7. Пономарева-Степная М. А., Алфеева Л. Ю., Максимова Л. А., Незавибат'ко В. Н., Каменский А. А., Антонова Л. В., Ашмарин И. П. Хим.-фармацевт ж., 1981, т. XV, № 10, с. 37–42.
8. Horinishi H., Hachimori Ju., Kutihara K., Shibata K. Biochim. et biophys. acta, 1964, v. 86, № 2, p. 477–489.
9. Kinard F. E. Rev. Sci. Instrum., 1957, v. 28, p. 293–295.

Поступила в редакцию

7.VIII.1981

После доработки

15.X.1981

#### PREPARATION OF $[^{14}\text{C}$ -ACETYL] FRAGMENT (4–7) OF ADRENOCORTICOTROPIN

MAKSIMOVA L. A., PETRENKOV B. V., NEZAVIBAT'KO V. N., PONOMAREVA-STERNAYA M. A., MYASOEDOV N. F.

*Institute of Molecular Genetics, Academy  
of Sciences of the U S S R, Moscow*

A  $[^{14}\text{C}]$ acetylated fragment of ACTH<sub>4–7</sub> has been prepared using 4-nitrophenyl- $[^{14}\text{C}]$ acetate of 5,47 Ci/mol activity. The peptide may be used as a radioactive label for studying the mechanism of action of this bioregulator.