

ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 547.96.07

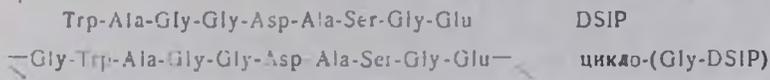
DSIP: ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И ФУНКЦИЕЙ.
СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКОГО АНАЛОГА ЦИКЛО-(Gly—DSIP).

А. С. САРГСЯН

Научно-исследовательский институт «Биотехнология», Ереван

Поступило 15 IV 1994

С целью выявления роли свернутых структур в биологической активности DSIP (Delta-Sleep Inducing Peptide) или пептида дельта-сна был синтезирован первый циклический аналог, в котором N- и C-концы соединены через Gly мостик—цикло-(Gly-DSIP).



Синтез цикло-(Gly-DSIP) осуществлен циклизацией линейного защищенного декапептида (получен конденсацией двух пентапептидных белков) методом активированных пентахлорфениловых эфиров. Конечный продукт выделен ионообменной хроматографией на DEAE—сефадексе А-25. Гомогенность цикло-(Gly-DSIP) была подтверждена тонкослойной хроматографией, аминокислотным анализом, высокоэффективной жидкостной хроматографией в обратно-фазовом режиме и спектром ИУ-ЯМР высокого разрешения (300 МГц). Цикло-(Gly-DSIP) сохранял полную биологическую активность DSIP в тесте на идентифицированных нейронах виноградной улитки. Этот результат подтвердил предположение, что свернутые структуры включены в биологическое действие DSIP.

Табл. 1, библиограф. ссылок 19.

В ряде работ описаны попытки выделения и идентификации гуморальных факторов, вовлеченных в процесс возникновения и поддержания сна [1—4]. Одним из них является пептид дельта-сна или DSIP—Delta-Sleep-Inducing Peptide (1), выделенный Монье и сотр. из мозговой венозной крови кроликов, у которых электрической стимуляцией таламуса индуцировался сон [3, 4].

С целью изучения взаимосвязи между структурой, пространственным строением и биологической функцией этого нейропептида был предпринят синтез природного фактора и ряда его линейных аналогов, исследованы биологические свойства и конформационные характеристики синтезированных соединений [5—7]. Выявлено, что DSIP обладает выраженным антистрессорным эффектом [6], а также рядом других воздействий на организм животных. Показано, что DSIP является нейромодулятором и осуществляет свое действие путем влияния на серотонинэргические и гистаминэргические нейромедиаторные системы [7, 8].

На основании результатов исследования пространственного строения DSIP методами КД—кругового дихроизма, Раман-лазерной, флуо-

ресцентной и N^1 -ЯМР спектроскопии было показано, что конформационное равновесие DSIP в водных растворах характеризуется присутствием свернутых псевдоциклических структур [5].

Для выявления роли свернутых структур в биологической активности был предпринят синтез аналога с ограниченной конформационной подвижностью, моделирующего свернутую структуру DSIP. При этом учитывалось также, что ограничение конформационной подвижности молекулы и стабилизация «биологически активной» конформации представляют собой перспективный путь поиска более активных аналогов природных пептидов или аналогов с улучшенным спектром биологической активности. Целесообразность такого подхода была экспериментально подтверждена в синтезе циклических аналогов брадикинина, каллидина, тафнина, ангиотензина и ряда других биологически активных пептидов, обладающих значительной и избирательной биологической активностью и в ряде случаев пролонгированным действием (до нескольких часов) [9—10].

В качестве объекта синтеза был выбран циклический аналог DSIP, в котором N - и C -концевые группы исходной молекулы соединены между собой через глициновый мостик. Этот аналог является первым из возможной серии циклических аналогов DSIP, которую можно логически представить на основе результатов спектральных исследований нативной молекулы.



Выбор схемы синтеза циклического аналога (II), помимо трудностей, связанных с особенностями аминокислотного состава (Trp—не выдерживающего сильных ацидолитических реагентов, Asp—склонной к транспептидации и др.), успешно преодоленных при синтезе линейных аналогов, осложнялся, как показал опыт, ограниченностью в подборе методов циклизации, не позволяющих широкого варьирования защитных групп, конденсирующих и деблокирующих агентов.

Выбранная нами схема синтеза циклического аналога (схема) предполагала такую разбивку молекулы DSIP, при которой не только конденсация блоков при получении линейного защищенного декапептида, но и стадия циклизации проходили бы по оптически неактивному остатку глицина.

Для блокирования боковых цепей Asp, Ser, Glu и N^2 -функции в ходе синтеза использовали Boc (трет-бутилоксикарбонил), Bzl (бензил), Z (бензйлоксикарбонил) защитные группы. C -концевые карбоксильные группы остатков Gly защищали путем их превращения в трет-бутиловые (OBu^t) эфиры или оставляли незащищенными.

Для избирательного удаления Boc-группы в присутствии трет-бутильной пептиды обрабатывали разбавленной водной 50% муравьиной кислотой при 15° (0,5 ч). Синтез отдельных фрагментов осуществляли

4	5	6	7	8	9	1	2	3	
Gly	Asp	Ala	Ser	Gly	Glu	Gly	Trp	Ala	Gly
								Z-ONSu	H-OH
								III	-OH
			Boc- Bzl	H- OBu ^t			Z- ONSu	H-	-OH
			Boc- Bzl	VIII -OBu ^t			Z-	IV	-OH
			Boc- Bzl	VIIIa -OBu ^t		Z- ONSu	H-	IVa	-OH
		Boc- IX	H- Bzl	-OBu ^t		Z-	V		-OH
		Boc- IXa	Bzl	-OBu ^t			Va		-OH
	Boc- OBzI	H-	Bzl	-OH	Boc- OBzI	ONp II-			-OH
	Boc- OBzI	X	Bzl	-OH	Boc- OBzI		VI		-OH
	Boc- OBzI	Xa	Bzl	-OH	Boc- OBzI		VII		-OPcp
Boc- ONp H-	OBzI	XI	Bzl	IBu- OCOCi	H- OBzI		VIIa		OPcp
Boc-	OBzI		Bzl	XII -OH	H- OBzI				OPcp
Boc-	OBzI		Bzl	XIIa	H- OBzI				OPcp
H-									OPcp
			1. TЭA/ 2. H ₂ /	DMФ, 40° Pd ↓					

Цикло (Gly-DSIP) (II)

методом активированных эфиров последовательным наращиванием цепи с С-конца. Очистку защищенных пептидов проводили кристаллизацией. Гомогенность веществ контролировали аминокислотным анализом и тонкослойной хроматографией.

Для получения циклического аналога DSIP наш выбор был остановлен на методе активированных пентахлорфениловых эфиров [11] (схема), оказавшемся наиболее подходящим из ряда опробованных активирующих и конденсирующих агентов, применение которых не привело к получению циклического аналога. Так, при использовании реактива Вудворда [12], хлористого тиофила в диметилформамиде (DMФА) [13], *N,N*-дициклогексилкарбодимиде с 1-оксибензотриазолом (DCC/НОВТ) [13] и метода смешанных ангидридов (REMA-Repellitive excess mixed anhydride) [14] продукты циклизации, как показали результаты высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (Zorbax-Sil, DMФА), представляли собой смеси с низким содержанием фракций с нужным молекулярным весом, в связи с чем выделение последних оказалось затруднительным. При циклизации через «Комплекс F» [10], хотя и удалось выделить фракцию с нужным молекулярным весом (высокоэффективная хроматография в режиме эксклюзии), но дальнейший анализ N-концевой аминокислоты и аминокислотный анализ гидрированного над Pd-чернью и очищенного ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-сефадексе А-25 продукта циклизации показали, что последний представляет исходный линейный пептид.

Таким образом, ни один из перечисленных методов не привел к получению циклического аналога, в то время как применением метода активированных пентахлорфениловых эфиров (схема) удалось получить его с удовлетворительным выходом (11%). При использовании для циклизации этого метода предварительно получали активированный эфир С-концевого пентапептида (VII) (схема)). Причем, если пентахлорфениловый эфир пентапептида (VII) получали с высоким выходом (62%) в гомогенном виде, то при получении других активированных эфиров, например, *p*-нитрофенилового [15], образовывалась трудноразделимая смесь продуктов, в связи с чем выбор был остановлен на первом. Восзащитные группы с пентахлорфенилового эфира пентапептида (VII) и пентахлорфенилового эфира декапептида (XII), полученного REMA методом и гомогенного по ТСХ и в условиях высокоэффективной хроматографии, осторожно удаляли 50% $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{SnCl}_4$ (0,5—1 ч при 4°). Эти условия оказались наиболее подходящими для предотвращения разрушения пентахлорфенилового эфира в условиях ацидолиза.

Циклизацию проводили в свежеперегнанном, сухом DMФА в течение 3 суток при 40°. Продукт циклизации после аналитической хроматографии в режиме эксклюзии, выявившей преимущественное содержание фракции с *M. v.* 1100—1299, гидрировали в DMФА над Pd-чернью и затем хроматографировали на колонке с ДЕАЕ-сефадексом А-25 в градиенте 0,2—0,3 М AcONH_4 . В ходе ионообменной хромато-

графии были получены четыре фракции. Все они имели удовлетворительные аминокислотные анализы, однако при определении N-концевой аминокислоты дансильным методом оказалось, что три из них имели на N-конце остаток Gly, в то время как для одной из них обнаружить N-концевую аминокислоту не удалось. В связи с этим было предположено, что пептид, соответствующий этой фракции, имеет циклическое строение. ^1H -ЯМР спектр (300 МГц) этого продукта обнаружил наличие всех аминокислотных остатков и десяти NH-групп (H_2O , pH 4.4, 22°).

Полученные данные (аминокислотный анализ, отсутствие N-концевой аминокислоты и ^1H -ЯМР спектр) в совокупности свидетельствовали о том, что структура выделенного вещества соответствует цикло-(Gly-DSIP).

Гомогенность синтезированного циклического аналога—цикло-(Gly-DSIP) (II) контролировалась тонкослойной хроматографией, аминокислотным анализом и высокоэффективной жидкостной хроматографией в обратно-фазовом режиме.

Биологическая активность цикло-(Gly-DSIP) исследовалась *in vitro* на идентифицированных нейронах виноградной улитки *Helix lucorum* L.*. Было показано, что цикло-(Gly-DSIP) в концентрации $5 \times 10^{-6}\text{M}$ полностью воспроизводит активность DSIP (урежение частоты спонтанной импульсной активности и гиперполяризационный сдвиг потенциала покоя).

Таблица

Значения хим. сдвигов NH-протонов δ (NH), констант спин-спинового взаимодействия J (NH—C^αH) и температурные коэффициенты $\Delta\delta/\Delta T \cdot 10^{-3}$ м. д./град. DSIP и цикло-(Gly-DSIP)

Аминокислотный остаток	δ (NH)		J (NH—C ^α H)		$\Delta\delta/\Delta T \cdot 10^{-3}$ м. д./град	
	DSIP	цикло-(Gly-DSIP)	DSIP**	цикло-(Gly-DSIP)	DSIP**	цикло-(Gly-DSIP)
Trp ¹		7,85		6,4		4,3
Ala ²	8,52	8,27	6,5	5(8)	6,4	4,7 (2,7)
Asp ⁵	8,25	8,15	7,8	7,3	5,3	3,3
Ala ⁶	8,30	8,17	6,4	6,2	6,4	6,0
Ser ⁷	8,25	8,23	7,1	7,4	5,3	4,8
Glu ⁹	7,82	8,27	8,4	8(5)	4,2	2,7 (4,7)
		8,02		—		6,0
Gly ³	7,65	8,10	12,2	—	5,1	3,3
Gly ⁴	8,26	8,27	12,5	—	5,1	5,0
Gly ⁸	8,11	8,36	12,0	—	5,5	5,5

H_2O , 32°, pH 4,4; ** pH 2,7.

* Исследования биологической активности цикло-(Gly-DSIP) на идентифицированных нейронах виноградной улитки выполнены Галеманом П. М. (НИИ по биологическим испытаниям химических соединений, Кувалия).

Исследования конформационных характеристик цикло-(Gly-DSIP) методом ^1H -ЯМР спектроскопии свидетельствуют о сходстве пространственных структур DSIP [5] и цикло-(Gly-DSIP) (табл.).* Так, константы спин-спинового взаимодействия $^3\text{J}(\text{NH}-\text{C}^2\text{H})$, температурные градиенты $\Delta\delta/\Delta T$ и хим. сдвиги NH-протонов цикло-(Gly-DSIP) существенно не отличаются от соответствующих значений для DSIP, в связи с чем можно предположить, что для цикло-(Gly-DSIP), также как и для DSIP, характерно присутствие в водном растворе равновесия структур, не стабилизированных ни ионными, ни водородными связями.

Исходя из данных биологической активности цикло-(Gly-DSIP) и данных ^1H -ЯМР спектроскопии, свидетельствующих о наличии в водном растворе циклического пептида подвижных, сходных со структурой DSIP, конформеров, можно заключить, что свернутая псевдоциклическая структура DSIP ответственна за проявление пептидом биологической активности.

Выражаю глубокую благодарность академику В. Т. Иванову (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина, Москва) за творческое руководство и всестороннюю поддержку в выполнении настоящей работы

Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты и производные фирм «Reanal» и «Serva». Ряд производных был приготовлен по известным методикам [16, 17]. Аминокислотные анализы кислотных гидролизатов пептидов (6 н. HCl, 20 ч, 110°). Температуры плавления (не исправлены) измерены в блоке Кофлера. Удельные вращения с точностью $\pm 1^\circ$ определены при 25° в дециметровой кювете на спектрополяриметре „Perkin-Elmer 141“ (США). Ионообменную хроматографию проводили на ДЕАЕ-сефадексе А-25 („Pharmacia“ Швеция), в аммоний-ацетатном буфере в градиентном режиме в интервале молярности буфера от 0,2 до 0,3, рН 6,7 (колонка 25×100 мм, нагрузка 30 мг). В качестве детектирующего прибора использовали «Uvicord («LKB», Швеция). Высокоэффективную эксклюзионную и обратно-фазовую хроматографии проводили на приборе фирмы «Waters» (США). Для эксклюзионной хроматографии использовали силикагель марки «Zorbax-Sil, в ДМФА (колонка 4,6×25 см, скорость 0,3 мл/мин, скорость 0,3—0,5 мл/мин, ввод 10 мкл, с 0,1, детекция — рефрактометрическим и УФ-280 нм детекторами). Для обратно-фазовой хроматографии использовали силикагель марки «Zorbax-ODS», (колонка 4,6×25 см, элюент—0,01 М CF_3COOH , рН 2,00, 15% ацетонитрил, скорость элюента 1 мл/мин). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках

* Исследования конформационных характеристик цикло-(Gly-DSIP) методом ^1H -ЯМР спектроскопии выполнены Балашовой Т. А. (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина, Москва).

с закрепленным слоем силикагеля фирмы «Мегск» (Германия) в хроматографических системах: хлороформ-этилацетат, 6:2 (А); хлороформ-этилацетат-метанол, 6:3:1 (Б); хлороформ-этилацетат-метанол, 12:6:1 (В); хлороформ-этилацетат-метанол-уксусная кислота, 6:3:1:1 (Г); хлороформ-метанол-10% NH_4OH , 60:40:1 (Д); этилацетат-гексан, 3:1 (Е); *n*-бутанол-уксусная кислота-вода, 4:1:1 (Ж); ацетон-вода, 4:1 (З).

Все используемые растворители предварительно перегоняли, растворители, применявшиеся при проведении реакций конденсации, абсолютировали обычным образом [18]. Для небольших пептидов (вплоть до пентапептидов) проводили элементный анализ, результаты которого удовлетворительно соответствовали теоретическим значениям.

Спектры ЯМР были сняты на спектрометре «С-300» фирмы «Varian» в режиме импульсного облучения с последующим Фурье-преобразованием, с насыщением остаточного сигнала НДО. В качестве растворителя использовалась D_2O фирмы «Изотоп». Концентрации измеренных растворов — 10^{-2}M , рН регистрировался непосредственно в ампуле до и после измерения спектра. Температура в объеме образца поддерживалась стандартной температурной приставкой с точностью $\pm 1^\circ$.

Эффект DSIP и его аналога цикло-(Gly-DSIP) на нейроны виноградной улитки оценивался по изменению основных показателей активности нейронов — частоты спонтанной импульсной активности и сдвига потенциала покоя, регистрируемых внутриклеточными микроэлектродами по стандартной электрофизиологической методике [19]. Для тестирования на электрофизиологических моделях пептиды растворяли в растворе Рингера для холоднокровных непосредственно перед введением в микрованночку объемом 10 мл с изолированной центральной нервной системой виноградной улитки [19]. Регистрировалась активность висцерального нейрона V17 виноградной улитки *Helix Lucorum* L. Эксперименты проводили при 20° . Температура добавляемых растворов (DSIP — $5 \times 10^{-6}\text{M}$, цикло-(Gly-DSIP) — $5 \times 10^{-6}\text{M}$ и 10^{-8}M) и омывающего центральную нервную систему раствора Рингера была одинакова. В качестве контроля вводили 1 мл раствора Рингера, не вызывавшего изменений в активности нейрона V17 ни в одном из опытов.

1 *Z-Ala-Gly-OH* (III). К раствору 0,82 г. (11,00 ммоль) *N*-Gly-OH в 25 мл воды добавляли 0,92 г (11,00 ммоль) NaHCO_3 . Через 15 мин при перемешивании и охлаждении до 0° постепенно приливали раствор 3,20 г (10,00 ммоль) *Z-Ala-ONSu* (*N*-оксисукцинимидный эфир *Z-Ala*) в смеси 10 мл диоксиана и 5 мл ДМФА и перемешивали 2 ч при 0° и 20 ч при 20° . Далее растворитель упаривали, к остатку добавляли раствор 0,2 *n* H_2SO_4 до кислой реакции, после чего полученный пептид (II) экстрагировали этилацетатом дважды. Объединенные этилацетатные вытяжки промывали насыщенным раствором NaCl до нейтральной реакции и сушили над Na_2SO_4 . Пептид (III) кристаллизовали из этилацетата. Получили 2,61 г (85%) пептида (III), т. пл. 121° ; $[\alpha]_D^{25} - 17.4$ (с 0,5 MeOH); R_f 0,38 (Д), 0,13 (Ж).

2. *Z-Trp-Ala-Gly-OH* (IV). а) 1,40 г (5,00 ммоль) пептида III гидрировали 3 ч над Pd-чернью в 25 мл MeOH, содержащего 1 мл ледяной уксусной кислоты. К реакционной смеси приливали 10 мл воды, катализатор отфильтровывали и растворитель упаривали. Ацетат дипептида (IIIa) получали с количественным выходом.

б) 1,03 г (5,00 ммоль) IIIa растворяли в 50 мл H₂O, добавляли 1,40 г (10,00 ммоль) NaHCO₃ и через 5 мин при охлаждении до 0° приливали раствор 2,18 г (5,00 ммоль) *Z-Trp-ONSu* (N-оксисукцинимидный эфир *Z-Trp*) в 20 мл ДМФА. Смесь перемешивали 2 ч при 0° и 20 ч при 20°, затем обрабатывали аналогично опыту 1. Пептид IV кристаллизовали из хлороформа. Получали 1,76 г (87%) пептида IV, т. пл. 210°, $[\alpha]_D^{25} = -12,0$ (с 0,5 MeOH); R_f 0,45 (Д), 0,87 (Ж).

3. *Z-Gly-Trp-Ala-Gly-OH* (V). а) 2,33 г (5,00 ммоль) пептида IV гидрировали в условиях опыта 2а. Ацетат трипептида AcOH·H-Trp-Ala-Gly-OH (IVa) получали с количественным выходом.

б) 1,96 г (5,00 ммоль) IVa растворяли в смеси 25 мл ДМФА и 25 мл H₂O, добавляли 1,40 г (10,00 ммоль) NaHCO₃ и через 5 мин при охлаждении до 0° приливали раствор 1,31 г (5,00 ммоль) *Z-Gly-ONSu* (N-оксисукцинимидный эфир *Z-Gly*) в 25 мл ДМФА. Смесь перемешивали 2 ч при 0° и 20 ч при 20°, затем обрабатывали согласно опыту 1. Получали 2,6 г (95%) пептида V (кристаллизация из смеси этилацетат/эфир), т. пл. 133°; $[\alpha]_D^{25} = -5,0$ (с 0,5 MeOH); R_f 0,33 (Д), 0,80 (Ж).

4. *Boc-Glu(OBzl)-Gly-Trp-Ala-Gly-OH* (VI). а) Из 2,70 г (5,00 ммоль) пептида V в условиях опыта 2а получали ацетат тетрапептида AcOH·H-Gly-Trp-Ala-Gly-OH (Va) с количественным выходом.

б) 2,33 г (5,00 ммоль) Va растворяли в 40 мл ДМФА, добавляли 1,10 мл (10,00 ммоль) N-метилморфолина и через 5 мин, при охлаждении до 0° приливали раствор смеси 2,29 г (5,00 ммоль) *Boc-Clu(OBzl)-ONr* и 0,68 г (5,00 ммоль) *HOBT* в 20 мл ДМФА. Перемешивали 20 ч при 20°, после чего реакционную смесь обрабатывали аналогично опыту 1, предварительно экстрагировав *n*-нитрофенол этилацетатом до подкисления раствора. Пептид VI кристаллизовали из смеси этилацетат—хлороформ—эфир. Получали 2,55 г (70%) пептида VI. Аминокислотный анализ: Gly 1,97 (2); Ala 1,04 (1); Glu 0,95 (1). Аморф.; $[\alpha]_D^{25} = -11,4$ (с 0,5; ДМФА); R_f 0,43 (Д), 0,82 (Ж).

5. *Boc-Glu(OBzl)-Gly-Trp-Ala-Gly-OPcp* (VII). 0,73 г (1,00 ммоль) пептида растворяли в 10 мл ДМФА, охлаждали до 0° и при перемешивании добавляли 0,23 г (1,10 ммоль) DCC и 0,29 г пентахлорфенола. Перемешивали при 0° 3 ч и 20 ч при 20°. Дициклогексилмочевину отфильтровывали, ДМФА упаривали до 5 мл и пентахлорфениловый эфир пептида (VII) осаждали из ДМФА этилацетатом, после чего перекристаллизовывали из этилацетата. Получали 0,6 г (62%) пептида VII, аморф.; $[\alpha]_D^{25} = -5,5$ (с 0,2; ДМФА) R_f 0,50 (Б), 0,73 (Г).

6. *Boc-Ser(Bzl)-Gly-OBu^t* (VIII). К раствору 2,31 г (11,00 ммоль) H₃PO₃·H-Gly-OBu^t в смеси 15 мл воды и 15 мл ДМФА при переме-

шивании и охлаждении до 0° порциями добавляли раствор 3,92 г (10,00 ммоль) *Вос-Ser (Bzl)-ONSu* в 15 мл ДМФА и 1,21 мл (11,00 ммоль) *N*-метилморфолина. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0° и 20 ч при 20°, после чего растворитель упаривали при 40°, остаток растворяли в этилацетате, промывали 10% лимонной кислотой, 5% NaHCO_3 , водой, высушивали над Na_2SO_4 и упаривали. Пептид VIII кристаллизовали из эфира. Получали 3,27 г (80%) пептида VIII, т. пл. 104°; $[\alpha]_D^{25} - 5,3$ (С 0,5; MeOH); R_f 0,75 (А), 0,85 (Е).

7. *Вос-Ala-Ser (Bzl)-Gly-OBu'* (IX). а) 2,05 г (5,00 ммоль) пептида VIII растворяли в 300 мл 50% водной муравьиной кислоты и выдерживали 1 ч при 15°. Раствор упаривали в вакууме при 20°, остаток растворяли в воде и остатки исходного пептида VIII экстрагировали из кислой среды этилацетатом, затем водный раствор подщелачивали 1 н, КОН до pH 8—9 и *H-Ser (Bzl)-Gly-OBu'* (VIIIa) экстрагировали этилацетатом. Экстракт промывали насыщенным раствором NaCl до нейтральной реакции, высушивали над Na_2SO_4 и растворитель упаривали досуха. Выход VIIIa 1,24 г (70%).

б) К раствору 3,55 г (10,00 ммоль) VIIIa в 50 мл этилацетата при перемешивании и охлаждении до 0° добавляли 2,86 г (10,00 ммоль) *Вос-Ala-ONSu*, реакционную смесь перемешивали 2 ч при 0° и 20 ч при 20°, после чего обрабатывали как описано в опыте 6. Трипептид IX кристаллизовали из смеси этилацетат/эфир. Получали 3,98 г (83%) пептида IX, т. пл. 125°; $[\alpha]_D^{25} - 16,4$ (С 0,5; MeOH); R_f 0,63 (В), 0,46 (Е).

8. *Вос-Asp (OBzl)-Ala-Ser (Bzl)-Gly-OH* (X). а) 4,8 г (10,00 ммоль) пептида IX растворяли в 50 мл CF_3COOH и выдерживали 1 ч при 20°. CF_3COOH упаривали в вакууме при 40° и *CF}_3\text{COOH-H-Ala-Ser (Bzl)-Gly-OH}* (IXa) высушивали в вакууме над NaOH. Получали 4,7 г (95%) пептида IXa.

б) К раствору 2,47 г (5,00 ммоль) пептида IXa в 20 мл ДМФА при охлаждении до 0° и перемешивании добавляли 1,10 мл (10,00 ммоль) *N*-метилморфолина и 2,10 г (5,00 ммоль) *Вос-Asp (OBzl)-ONSu*. Смесь перемешивали 2 ч при 0° и 20 ч при 20°. ДМФА частично упаривали, остаток растворяли в этилацетате, промывали раствором лимонной кислоты, водой и высушивали над Na_2SO_4 . Пептид X кристаллизовали из этилацетата. Получали 2,43 г (78%) пептида X, т. пл. 131°; $[\alpha]_D^{25} - 7,2$ (с 0,5; ДМФА); R_f 0,50 (Г), 0,80 (Ж).

9. *Вос-Gly-Asp (OBzl)-Ala-Ser (Bzl)-Gly-OH* (XI). а) Из 3,23 г (5,00 ммоль) пептида X, растворенного в 20 мл 50% $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CHCl}_3$ в условиях опыта 8а получали трифторацетат тетрапептида (XIa) с количественным выходом.

б) 3,30 г (5,00 ммоль) XIa растворяли в 30 мл ДМФА, добавляли 1,10 мл (10,00 ммоль) *N*-метилморфолина и через 5 мин при перемешивании приливали раствор смеси 1,48 г (5,00 ммоль) *Вос-Gly-ONp* и 0,68 г (5,00 ммоль) НОВТ в 20 мл ДМФА. Перемешивали 20 ч при 20°, после чего ДМФА частично упаривали, к остатку добавляли воду и п-ни-

трофенол экстрагировали этилацетатом, водный раствор подкисляли лимонной кислотой и пептид XI экстрагировали дважды этилацетатом. Объединенные этилацетатные вытяжки промывали водой до нейтральной реакции, сушили над Na_2SO_4 и кристаллизовали из этилацетата. Получали 2,82 г (83%) пептида XI. Аминокислотный анализ: Gly 2,05 (2); Ala 0,97 (1); Ser 0,95 (1); Asp 1,02 (1); аморф.; $[\alpha]_D^{25} = -16,0$ (с 0,5; ДМФА), R_f 0,62 (Г), 0,78 (Ж).

10. *Boc-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Trp-Ala-Gly-OPcp* (XII). а) 1,07 г (1,10 ммоль) пептида VII растворяли в 25 мл 50% $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CHCl}_3$ и выдерживали при 4–0,5 ч. CF_3COOH упаривали при 25°, остаток обрабатывали эфиром. Выход CF_3COOH . *N-Glu(OBzl)-Gly-Trp-Ala-Gly-OPcp* (VIIa) 1,03 г (95%), аморф. $[\alpha]_D^{25} = -21,6$ (с 0,1; ДМФА); R_f 0,38 (Г), 0,60 (Ж).

б) К раствору 0,79 г (1,15 ммоль) пептида XI, в 20 мл ДМФА добавляли 0,13 мл (1,15 ммоль) *N*-метилморфолина, смесь охлаждали до -15° и приливали 0,15 мл (1,10 ммоль) изобутилхлорформата. Через 3 мин к смеси добавляли охлажденный до -15° раствор 0,99 г (1,00 ммоль) VIIa в 20 мл ДМФА и 0,11 мл (1,00 ммоль) *N*-метилморфолина. Перемешивание продолжали 3 ч при -15° и 1 ч при 0° . К реакционной смеси приливали насыщенный раствор NaHCO_3 , выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, *n*-бутанолом, этилацетатом и сушили в вакууме. Получали 0,9 г (59%) пептида XII. Аминокислотный анализ: Gly 4,02 (4); Ala 1,97 (2); Ser 0,96 (1); Glu 1,05 (1); Asp 1,02 (1); аморф.; $[\alpha]_D^{25} = -15,4$ (с 0,2; ДМФА); R_f 0,75 (Г), 0,81 (Ж).

11. *Цикло-Gly-Asp(OBzl)-Ala-Ser(Bzl)-Gly-Glu(OBzl)-Gly-Trp-Ala-Gly* (XIII). а) Из 0,15 г (0,10 ммоль) пептида XII в условиях опыта 9а получали 0,14 г (90%) трифторацетата пентахлорфенилового эфира декапептида (XIIIa).

б) 0,10 г (0,065 ммоль) XIIIa растворяли в 300 мл ДМФА и по каплям при перемешивании медленно прибавляли 7,8 мкл (0,65 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь выдерживали в течение 3 суток при 40° , после чего ДМФА упарили в вакууме при 30° и остаток обрабатывали эфиром.

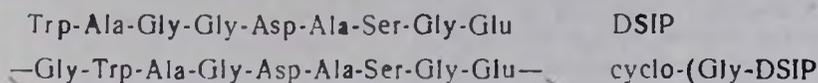
12. *Цикло-(Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-Gly-Trp-Ala-Gly)* (II). 0,1 г сырого продукта циклизации (опыт IIб) гидрировали над Pd-чернью 10 ч в 20 мл ДМФА, содержащего 1 мл CH_3COOH . Растворитель упаривали, остаток, предварительно растворенный в воде, лиофилизировывали. Сырой продукт (30 мг) хроматографировали на ДЕАЕ-сефадексе А-25 в ступенчатом градиенте 0,2–0,3 М AcONH_4 , pH 6,7. Получали 5 мг (11%) циклического пептида (II). Аминокислотный анализ: Gly 3,97 (4); Ala 2,03 (2); Ser 0,98 (1); Asp 0,95 (1); Glu 1,02 (1); $[\alpha]_D^{25} = -70,0$ (с 0,2; H_2O); R_f 0,45 (Ж), 0,73 (З).

DSIP: ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԻ ԵՎ ՅՈՒՆԿՑԻԱՅԻ ՓՈԽԿԱՊԱԿՑՈՒԹՅՈՒՆԸ:

Ցիկլիկ ԱՆԱԼՈԳ-ՑԻԿԼՈ-(Gly-DSIP)-Ի ՍԻՆԹԵԶԸ

Հ. Ս. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

Սինթեզվել է դելտա քնի պեպտիդի կամ DSIP-ի (Delta-Sleep Inducing Peptide) առաջին ցիկլիկ անալոգը, որում C և N ծայրերը միացված են Gly-կամրջակով՝ ցիկլո-(Gly-DSIP):



Ցիկլո-(Gly-DSIP)-ի սինթեզը իրականացվել է պաշտպանված գծային դեկապեպտիդի պենտաքլորֆենիլային եթերի (ստացված է երկու պենտապեպտիդների կոնդենսացիայի միջոցով) ցիկլիզացիայով:

Վերջանյութը անջատվել է իոնոփոխանակային քրոմատոգրաֆիայի օգնությամբ DEAE-սեֆադեքս A-25-ի վրա: Ցիկլո-(Gly-DSIP) հոմոգենոթյունը հաստատված է նուրբ շերտ քրոմատոգրաֆիայի, ամինաթթվային անալիզի, շրջված-ֆազային բարձր էֆեկտիվության հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի և բարձր թույլատրման H¹-ՄՄՌ (300 ՄՀց) սպեկտրների տրվյալներով:

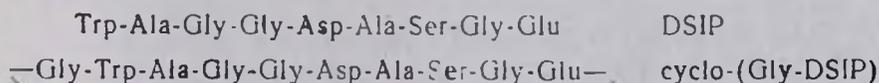
Խաղողի խխունջի իդենտիֆիկացված նեյրոնների վրա փորձարկելիս ցիկլո-(Gly-DSIP) ամբողջությամբ պահպանում է կենսաբանական ակտիվությունը: Այդ արդյունքը հաստատում է, որ ցիկլիկ կառուցվածքները ներգրավված են DSIP-ի կենսաբանական ակտիվության իրագործման մեջ:

DSIP: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP.

THE SYNTHESIS OF CYCLIC ANALOG—CYCLO (GLY-DSIP)

A. S. SARGSYAN

In order to probe the significance of folded structure in biological action of DSIP (Delta-Sleep Inducing Peptide) we have synthesized a first cyclic analog in which the N- and C-termini were joined by a Gly moiety.



Cyclo-(Gly-DSIP) was synthesized by cyclization of protected linear decapeptide pentachlorophenyl ester (obtained by pentapeptide segment condensation). The final product was isolated by ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25. Purity of cyclo-(Gly-DSIP) was checked by thin-layer chromatography, amino acid analysis, reversed phase high performance liquid chromatography and NMR spectra (300 MHz). Testing of cyclo-(Gly-DSIP) on small identified neurons showed that in this system it is as active as DSIP itself. The results obtained confirm our earlier statement that folded structure might be involved in biological action of DSIP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nagasaki H., Irtki M., Inoue S., Ushizono K. — Proc. Japan Acad., 1974, v. 50, № 3, p. 241.
2. Pappenheimer J. R., Koski G., Fencel U., Karnovsky M. L., Kruöger J. — J. Neurophysiol., 1975, v. 38, № 12, p. 1299.
3. Schoenenberger G. A., Maier P. F., Tobler H. J., Monnier M. — Pflügers Arch., 1977, v. 369, № 1, p. 99.
4. Schoenenberger G. A., Monnier M. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 1282.
5. Mikhaleva I., Sargsyan A., Balashova T., Ivanov V. — Chemistry of Peptides and Proteins/Voelter W., Wunsch E., Ovchinnikov J., Ivanov V. — Berlin—New-York, Walter de Gruyter & Co, 1982, v. 1, p. 289.
6. Sudakov K. V., Ivanov V. T., Koptik E. V., Vedjuev D. F., Mikhaleva I. I., Sargsyan A. S. — The Pavl. J. Biol. Sci., 1983, v. 18, № 1, p. 1.
7. Ашмарин И. П., Доведова Е. Л. — ДАН СССР, 1980, т. 255, № 6, с. 1501.
8. Кричевская А. А., Бондаренко Т. И., Горошинская Н. А., Ходакова А. А., Муллаева И. И., Крупиенникова Е. Ю. — Нефтехимия, 1986, т. 5, № 4, с. 408.
9. Chlpens G., Nikiforovich G., Mutulis P. — Peptides. Structure and biological function/Gross E., Meienhofer J. — Rockford, Pierce Chemical Company, 1979, p. 567.
10. Мутулис Ф. К., Мышлякова Н. В., Катаев Б. С., Клуши В. Е., Чупек Г. И. — Тезисы V Всесоюзного симпозиума по химии и физике белков и пептидов. Баку, 1980, с. 218.
11. Hollosi M., Kaitar M. — Acta Chim. Hung., 1972, v. 73, № 2, p. 247.
12. Kopple K. D., Ohnishi M., Go A. — J. Am. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 15, p. 4264.
13. Hardy P. M., Kenner G. W., Sheppard R. C. — Tetrah., 1963, v. 19, № 1, p. 95.
14. Beyerman H. C., De Leer E. W. B., Floor J. — Recueil, 1973, v. 92, № 4, p. 481.
15. Ohno M., Izumiya N. — Bull. Chim. Soc. Japan, 1965, v. 38, № 11, p. 1831.
16. Fletcher G. A., Jones J. H. — Int. J. Pept. Prot. Res., 1972, v. 4, № 3, p. 317.
17. Fletcher G. A., Jones J. H. — Int. J. Pept. Prot. Res., 1975, v. 7, № 2, p. 91.
18. Гордон А., Форд Р. — Спутник химика. М., Мир, 1976.
19. Balaban P. M. — Acta Neurobiol. Exp., 1979, v. 39, № 2, p. 97.

Химический журнал Армении, т. 48, № 1—3, стр. 40—45 (1995 г.)

УДК 543.422+547.979.733

СТРУКТУРНО-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПОЛОСЫ В ИК СПЕКТРАХ
АКСИАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕЗО-ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИН-
АТОЖЕЛЕЗА (II) С С-ДОНОРНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Т. С. КУРТИКЯН, А. В. ГАСПАРЯН, М. Е. АКОНЯН и Г. А. ЖАМКОЧЯН

Армянский институт прикладной химии «АРИАК», Ереван

Поступило 30 III 1995

Получены аксиальные комплексы мезо-тетрафенилпорфиринатожелеза (II) (FeТФП) с карбонильным и изонитрильным лигандами — FeТФП-L₂ (L = CO, CNCH₃). Проведен анализ их ИК спектров в области структурно-чувствительных полос, обнаруженных в работе [1]. Показано, что в аксиальных комплексах с С-донорными лигандами имеют место те же спектральные закономерности, что и в ком-