



УДК 547.964.4.057:577.175.829'17

## ЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ВЕЩЕСТВА P

I. cyclo(11→5<sup>e</sup>)-[Lys<sup>5</sup>] ВЕЩЕСТВО P-(5-11)

Мауроне Г. Х., Мутулис Ф. К., Розите С. Х.,  
Мышлякова Н. В., Свирскис Ш. В., Клуша В. Е.,  
Чинене Г. И.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

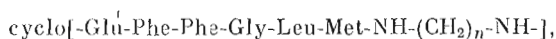
Осуществлены два варианта синтеза cyclo(11→5<sup>e</sup>)-[Lys<sup>5</sup>] вещества P-(5-11) (CLP). В первом из них пептидная цепь наращивалась ступенчато, исходя из *трет*-бутилового эфира глицина. При деблокировании гексапептида с одновременным удалением Вос- и Ви<sup>4</sup>-групп наблюдалось побочное *трет*-бутилирование остатка метионина. Циклизация осуществлена с промежуточным образованием пентафторфенилового эфира; полученный Z-CLP деблокировали переносным гидрированием. При повторной наработке линейного предшественника CLP использована стратегия блочной конденсации (3+4). Оптимизацией процессов циклизации и деблокирования Z-CLP удалось значительно повысить выход и упростить синтез. Биологические испытания показали, что Z-CLP проявляет слабое миотропное действие на подвздошной кишке морской свинки, а CLP в этом тесте неактивен; CLP не влияет на артериальное давление крыс, а Z-CLP вызывает лишь слабый двухфазный эффект. CLP подобно веществу P проявляет антидепрессивноподобное действие на центральную нервную систему в плавательном тесте на мышах.

Вещество P — ундекапептид H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> выполняет функции гормона и нейромедиатора в организме животных и человека. Изучение его биологического действия в настоящее время находится в центре внимания многих исследователей пептидов. Эффекты вещества P представляют также практический интерес. В частности, этот пептид обладает способностью устранить вызванные стрессовым состоянием нарушения функций сердечно-сосудистой и центральной нервной систем [1, 2]. Высокой биологической активностью обладают также многие аналоги и фрагменты вещества P. Однако пока не найдены производные биорегулятора, обладающие необходимой для лекарственных препаратов селективностью и пролонгированностью действия [1]. В этой связи значительный интерес вызывают циклические аналоги вещества P. Как известно, среди циклических аналогов брадикинина [3], ангиотензина [4], адренкортикотропина [5] и других гормонов [6] найдены соединения, обладающие избирательным и длительным действием. Кроме того, изучение циклоаналогов может привести к установлению так называемой биологически активной конформации биорегуляторов [6].

Результаты полуэмпирического расчета предполагают существование конформации, в которой активный центр вещества P, локализованный в С-концевом участке молекулы, имеет циклоподобную форму [7]. Учитывая это, для решения вышеуказанных проблем представляется перспективным исследовать циклические аналоги С-концевого участка пептида. Рассмотрение научной и патентной литературы показало, что уже получено более 30 циклических производных вещества P и интерес к данным соединениям продолжает расти [8-17].

Принятые сокращения: DCHA — дициклогексиламины, DIPEA — N,N-диизопропилэтиламин, DMF — диметилформамид, Np — *n*-нитрофенил, Pfp — пентафторфенил, CLP и Z-CLP — cyclo(11→5<sup>e</sup>)-[Lys<sup>5</sup>] вещество P-(5-11) и его N-бензилкарбонильное производное.

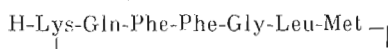
Первые результаты наших работ по данной тематике представлены в трех публикациях [15–17]. Нами осуществлен новый подход по закреплению структуры активного участка вещества Р, позволяющий от одного предшественника получить ряд циклопептидов. Таким образом, получено 9 соединений с общей формулой



где  $n=3-10, 12$  [17].

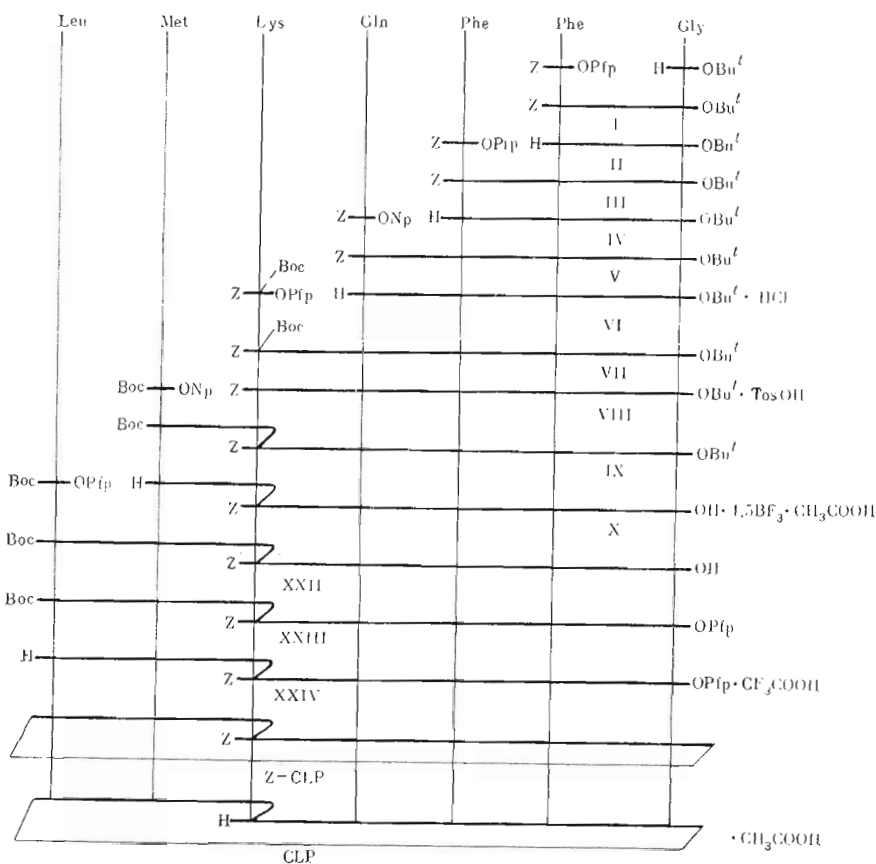
Однако мы полагали, что в процессе изучения циклических аналогов вещества Р целесообразно получить также соединения, имитирующие структуру биорегулятора, стабилизированную водородной связью между амидными группами боковой цепи остатков  $\text{Gln}^5$  и  $\text{Met}^{11}$ . О возможности подобного взаимодействия в молекуле вещества Р свидетельствуют полученные недавно результаты изучения конформации природного пептида методом ЯМР [18].

Таким образом, следующим объектом нашей работы стал неизвестный ранее циклопептид CLP, в котором остаток *L*-лизина, введенный в *N*-концевое положение фрагмента 5–11, через  $\varepsilon$ -аминогруппу соединен с карбоксильной группой метионина, находящегося на *C*-конце вещества Р:



или  $\text{cyclo}(11 \rightarrow 5^{\varepsilon})\text{-[Lys}^5\text{]}$  вещество Р-(5–11).

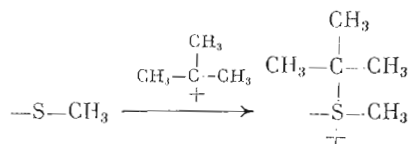
Схема 1



Синтез  $\text{cyclo}(11 \rightarrow 5^{\varepsilon})\text{-[Lys}^5\text{]}$  вещества Р-(5–11). Вариант I

При первом синтезе CLP (схема 1) пептидная цепь наращивалась с *C*-конца, исходя из *трет*-бутилового эфира глицина и используя пентафторфениловые эфиры *Z*-аминокислот. После присоединения  $\text{N}^{\alpha}\text{-Z}$ ,  $\text{N}^{\varepsilon}\text{-Boc}$ -

лизина у полученного пептида (VII) селективно действием *n*-толуолсульфокислоты была удалена Вос-группа, присоединен Вос-метионин и отщеплены концевые защитные группы эфиром трифторида бора в уксусной кислоте. Однако при этом наблюдалась сильно выраженная побочная реакция — рядом с небольшим количеством соединения (X) образовался продукт, обладающий аномально низкой хроматографической подвижностью ( $R_f$  0,16 (I)) и высокой электрофоретической подвижностью. В ПМР-спектре обнаружен новый сигнал при  $\delta=1,47$  м.д. Эти данные позволили установить, что произошло алкилирование тиоэфирной функции остатка метионина возникающим при отщеплении защитных групп *трет*-бутилкатионом:

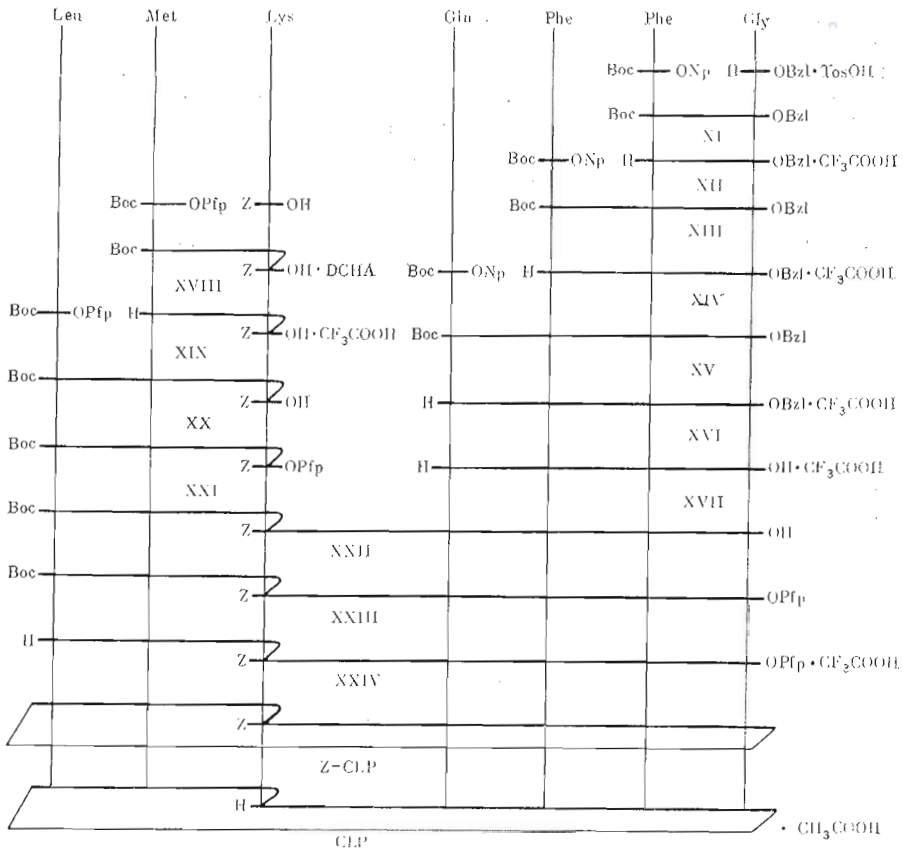


Подобная реакция имела место при получении вещества Р [19]. По-видимому, в нашем случае побочной реакции способствовала возникшая при одновременном удалении двух групп относительно высокая концентрация *трет*-бутилкатиона. Восстановление в молекуле тиоэфирной функции удалось осуществить нагреванием продукта реакции в уксусной кислоте. Присоединение производного лейцина, активирование С-концевой карбоксильной группы и удаление Вос-группы трифторуксусной кислотой привели к трифторацетату активированного эфира (XXIV), циклизация которого была осуществлена в разбавленном диоксановом растворе при добавлении *N,N*-диизопропилэтиламина. Образовавшаяся смесь веществ была разделена хроматографией на силикагеле и защищенный циклопептид Z-CLP идентифицирован при помощи ЯМР и масс-спектрометрии с десорбцией по полю. Затем проведено отщепление Z-группы переносным гидрированием в присутствии муравьиной кислоты. Для получения CLP в ацетатной форме его выделение осуществлено при переупаривании с уксусной кислотой; отсутствие формат-иона после обработки доказано спектроскопией ПМР. Для очистки пептида снова использовали хроматографию на силикагеле. Циклическая структура конечного продукта доказана расщеплением его химотрипсином. Как и ожидалось, при этом образуется лишь один продукт.

Согласно второму варианту (схема 2), синтез CLP осуществляли, исходя из бензилового эфира глицина. Последовательное наращивание пептидной цепи привело к свободному тетрапептиду (XVII). Другой пептидный блок синтезировали, не маскируя карбоксильную группу С-концевого лизина. Как удачу рассматриваем кристаллизруемость дидициклогексиламмониевой соли дипептида (XVIII). Это позволило получить пептиды (XVIII) и (XIX) в чистом виде, не используя хроматографические методы. Затем присоединяли остаток лейцина, продукт очищали на силикагеле и полученный трипептид (XX) превратили в его пентафторфениловый эфир (XXI), который использовали для конденсации с тетрапептидом (XVII). Выполнение последующих стадий практически не отличалось от предыдущего синтеза CLP, а соответствующие продукты обоих синтезов идентичны. Тем не менее удалось увеличить выход циклизации с 24 до 43%. Это, по-видимому, связано с использованием при повторном синтезе минимального количества силикагеля для очистки, что, вероятно, сильно сократило потери за счет необратимой адсорбции циклопептида. Учитывая этот опыт, конечный продукт вообще не подвергался хроматографической очистке (по данным ВЭЖХ, содержание основного вещества в нем около 95%, рис. 1), и выход на последней стадии увеличился с 36 до 75%.

Для биологических испытаний использованы CLP, Z-CLP и вещество Р в качестве стандарта.

В опытах *in vitro* на изолированной подвздошной кишке морской свишки была изучена миотропная активность пептидов. Установлено, что



Синтез cyclo(11→5<sup>ε</sup>)-[Lys<sup>5</sup>] вещества P(5-11). Вариант II

в диапазоне концентраций  $10^{-10}$ – $10^{-5}$  М CLP не проявляет миотропного действия, а активность Z-CLP характеризуется параметрами \*  $\alpha=0,55 \pm 0,18$  и  $pD_2=7,97 \pm 0,20$  (рис. 2).

В опытах *in vivo* на наркотизированных крысах CLP в дозах 0,5 и 5 нмоль/кг в 40% случаев проявляет зависимый от дозы гипотензивный эффект, который длится 1–2 мин и составляет по максимуму 50% от эффекта вещества P. При дальнейшем увеличении дозы (50 и 500 нмоль/кг) увеличения гипотензивного эффекта CLP не наблюдается, но вслед за ним, аналогично действию вещества P, развивается прессорный эффект, после которого не наступает повторного падения давления (рис. 3). Z-CLP не влияет на артериальное давление наркотизированных крыс.

Установлено, что CLP при внутривенном введении в диапазоне доз 0,01–5 мг на 1 кг массы животного достоверно укорачивает время иммобилизации животных в плавательном тесте на мышах по Порсолту [20]. Действие циклонептида CLP качественно и количественно сравнимо с влиянием вещества P. Максимальный эффект CLP наблюдается при дозе 5 мг/кг, когда время иммобилизации уменьшается на  $63,4 \pm 5,8\%$  по сравнению с контрольными животными (рис. 4).

Таким образом, результаты биологического тестирования CLP и Z-CLP показали, что эти циклонептиды проявляют слабое миотропное и прессорное действие. Более ярко выражен антидепрессивноподобный эффект CLP на центральную нервную систему. Наблюдается значительное качественное сходство эффектов CLP и природного гормона. Оно проявляет-

\*  $\alpha$  – внутренняя активность по отношению к веществу P; характеризует способность вещества вызывать эффект;  $pD_2$  – показатель специфического сродства, характеризует способность вещества связываться с рецептором.

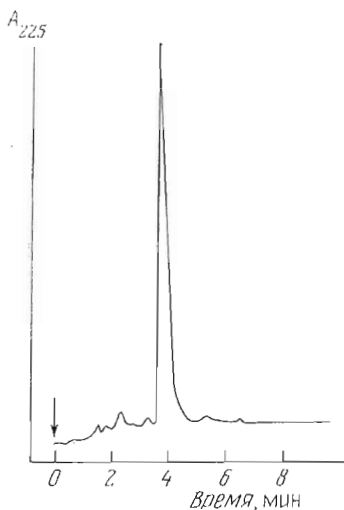


Рис. 1

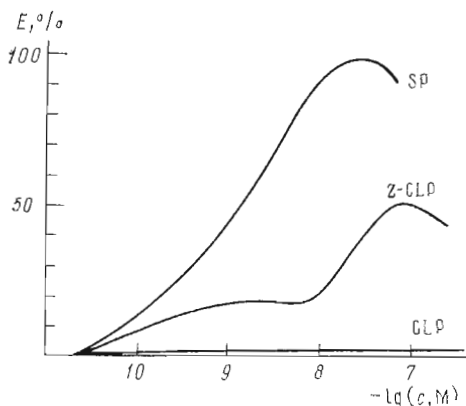


Рис. 2

Рис. 1. Аналитическая хроматограмма ацетата CLP (второй синтез). Прибор DuPont 830, колонка 0,46×25 см, носитель — Zorbax ODS. Элюент — CH<sub>3</sub>CN — 0,1 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (45 : 55); скорость элюции 1,6 мл/мин

Рис. 2. Кумулятивные кривые «концентрация — эффект» для вещества P(SP) и Z-CLP. Показано отсутствие эффекта у CLP

ся в двухфазовом характере влияния на артериальное давление, а также в одинаковой направленности воздействия на центральную нервную систему. Это позволяет предположить сходный механизм биологического действия обоих пептидов. Полученные данные подтверждают мнение о селективности биологического действия циклических аналогов линейных пептидов и свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения циклических аналогов вещества P.

### Экспериментальная часть

Для синтеза использовали производные аминокислот L-ряда (Reanal, Венгрия). Упаривание проводили на вакуумном ротационном испарителе при 30° С. Температуры плавления, определенные в открытых капиллярах, приведены без исправления. Индивидуальность полученных соединений проверяли с помощью ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ) в системах: хлороформ — этанол — этилацетат — уксусная кислота — вода, 85 : 5 : 8 : 2 : 0,25 (А); хлороформ — этанол — *n*-бутанол — этилацетат — вода, 10 : 6 : 4 : 3 : 1 (Б); хлороформ — этанол — вода, 40 : 47 : 5 (В); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5 (верхняя фаза) (Г); хлороформ — уксусная кислота — вода, 2 : 3 : 1 (нижняя фаза) (Д); система А — хлороформ, 1 : 1 (Е); система А — изопропанол, 4 : 1 (Ж); система Б — этилацетат, 1 : 1 (З); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 85 : 5 : 3 (И). Электрофорез осуществляли на бумаге FN-16 (ГДР) в 1 или 5 н. уксусной кислоте, приведена электрофоретическая подвижность относительно гистидина ( $E_{\text{HIS}}$ ). Вещества обнаруживали в УФ-свете, а также с помощью ингидрина или хлора и бензидина.

Строение соединений подтверждалось спектроскопией НМР. Спектры растворов в дейтерированном диметилсульфоксиде получали на приборе Bruker WH-90 или Bruker WH-360 (ФРГ); химические сдвиги, форма и интенсивность сигналов соответствовали строению пептидов. Аминокислотный анализ выполнен на анализаторе Biosal BC-200 (ФРГ) после 24-часового гидролиза 6 н. соляной кислотой в запаянной ампуле при 110° С.

*Z-Phe-Gly-OBu<sup>t</sup>* (I). К раствору 165 г (0,355 моль) *Z-Phe-OPip* [21] в 500 мл хлороформа добавляли 46,5 г (0,355 моль) *H-Gly-OBu<sup>t</sup>* [22] и 60,7 мл (0,355 моль) DPEA и выдерживали 20 ч при 20° С. Затем реакционную смесь промывали последовательно 500 мл 10% KHSO<sub>4</sub>, 500 мл воды, высушивали безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и фильтрат упаривали. При растирании остатка с гексаном образовывался белый кристаллический осадок. Выход 120 г (83%), т. пл. 88–90° С.  $[\alpha]_D^{20}$   $-24^\circ$  (с 1, DMF).  $R_f$  0,75 (А), 0,83 (З). Найдено, %: С 66,44; Н 6,69; N 6,50. C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Вычислено, %: С 66,97; Н 6,84; N 6,79.

*Z-Phe-Phe-Gly-OBu<sup>t</sup>* (III). 105 г (0,254 моль) соединения (I) гидрировали в 300 мл тетрагидрофурана в присутствии Pd-черни в течение 10 ч. Затем реакционную смесь фильтровали, катализатор на фильтре промывали 50 мл тетрагидрофурана, а в объ-

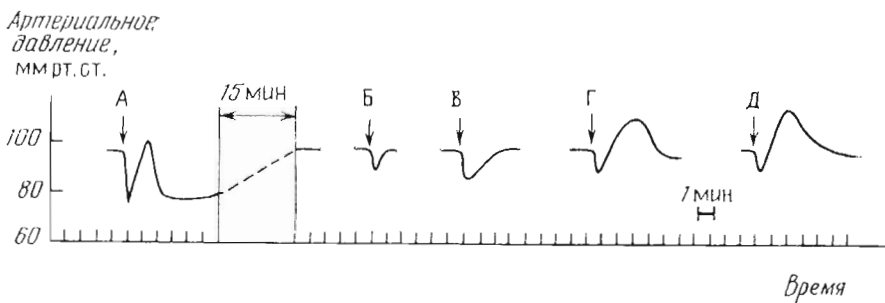


Рис. 3. Схематическое изображение влияния пептидов на артериальное давление наркотизированных крыс. А – вещество Р в дозе 7,64 мкмоль/кг, Б–Д – СLP в дозах 0,5; 5,0; 50 и 500 мкмоль/кг соответственно

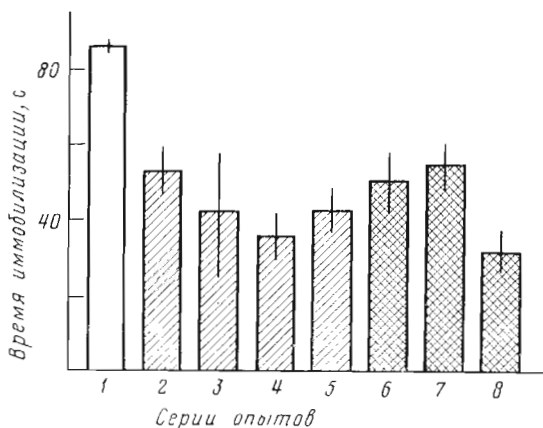


Рис. 4. Сравнительное влияние вещества Р и СLP на продолжительность поведенческой иммобилизации в тесте плавания на мышах. 1 – физиологический раствор (контроль), 2–5 – вещество Р в дозах 0,01; 0,1; 1 и 5 мг/кг, 6–8 – СLP в дозах 0,1; 1 и 5 мг/кг соответственно. Показана величина стандартной ошибки для каждой серии экспериментов

сдвинутый фильтрат, содержащий  $N$ -Phe-Gly-OBu<sup>t</sup> (II), добавляли 125 г (0,269 моль)  $Z$ -Phe-OPfp [21] и 43,4 мл (0,269 моль) DIPEA и выдерживали 20 ч при 20° С. Затем упаривали, остаток растворяли в смеси 500 мл этилацетата и 500 мл 10%  $KHSO_4$ , водный слой отделяли, а органический слой промывали последовательно 500 мл 10%  $KHSO_4$  и дважды 500 мл воды, высушивали безводным  $MgSO_4$ , фильтровали и фильтрат упаривали. Остаток закристаллизовывали растиранием с гексаном. Выход 120 г (85%), т. пл. 150–152° С.  $[\alpha]_D^{20} -29^\circ$  (с 1, DMF).  $R_f$  0,49 (А), 0,42 (Б), 0,85 (З). Найдено, %: С 68,24; Н 6,56; N 7,47.  $C_{32}H_{37}N_3O_6$ . Вычислено, %: С 68,68; Н 6,66; N 7,51.

$N$ -Phe-Phe-Gly-OBu<sup>t</sup> (IV). 115 г (0,205 моль) соединения (III) гидрировали 10 ч в 300 мл DMF в присутствии Pd-черни. Затем реакционную смесь фильтровали, катализатор на фильтре промывали 50 мл DMF и объединенный фильтрат упаривали. Полученное масло растирали с безводным эфиром, при этом образовался белый кристаллический осадок. Выход 80 г (92%), т. пл. 155–158° С.  $[\alpha]_D^{20} -17^\circ$  (с 1, DMF).  $R_f$  0,77 (Б), 0,87 (В), 0,33 (Г).  $E_{1118} 0,58$  (1 н.  $CH_3COOH$ ).

$Z$ -Gln-Phe-Phe-Gly-OBu<sup>t</sup> (V). К раствору 56,8 г (0,134 моль) соединения (IV) в 250 мл DMF добавляли 53,6 г (0,134 моль)  $Z$ -Gln-ONp и выдерживали 96 ч при 20° С. Затем реакционную смесь упаривали, осадок закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 85,0 г (93%), т. пл. 210–211° С.  $[\alpha]_D^{20} -28^\circ$  (с 1, DMF).  $R_f$  0,51 (А), 0,75 (З). Найдено, %: С 63,99; Н 6,34; N 9,86.  $C_{37}H_{45}N_3O_8$ . Вычислено, %: С 64,61; Н 6,59; N 10,18.

$N$ -Gln-Phe-Phe-Gly-OBu<sup>t</sup>-HCl (VI). 10 г (14,5 ммоль) соединения (V) гидрировали в 250 мл смеси DMF – вода (1:1) в присутствии Pd-черни при pH 7,6 (по мере протекания реакции добавляли 5 н. HCl, используя автотитратор БАТ-15). Спустя 3 ч смесь фильтровали, катализатор на фильтре промывали 50 мл DMF, затем объединенный фильтрат упаривали. Получили масло, которое закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 7,1 г (84%), т. пл. 142–144° С.  $[\alpha]_D^{20} -14^\circ$  (с 1, DMF).  $R_f$  0,23 (Б), 0,55 (В), 0,29 (Г).  $E_{1118} 0,52$  (1 н.  $CH_3COOH$ ). Найдено, %: С 59,65; Н 6,73; N 11,10.  $C_{29}H_{36}N_3O_6Cl$ . Вычислено, %: С 59,02; Н 6,83; N 11,87.

$Z$ -Lys(Вос)-Gln-Phe-Phe-Gly-OBu<sup>t</sup> (VII). К раствору 4,0 г (6,77 ммоль) соединения (VI) в 25 мл DMF добавляли 4,1 г (7,4 ммоль)  $Z$ -Lys(Вос)-OPfp [21] и 2,35 мл

(13,5 ммоль) DIPEA. Выдерживали 20 ч при 20° С, затем реакционную смесь упаривали, остаток растирали со смесью этилацетат – гексан (1 : 1). Образовавшийся осадок перемешивали со 100 мл 10% KHSO<sub>4</sub>, отфильтровывали, осадок на фильтре промывали водой, высушивали в эксикаторе при 1 мм рт. ст. над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Выход 5,3 г (87%), т. пл. 204–207° С.  $[\alpha]_D^{20}$  –23° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,16 (А), 0,74 (Ж), 0,72 (З).

*Z-Lys-Gln-Phe-Phe-Gly-OBu<sup>t</sup>-TosOH (VIII)*. К раствору 5,3 г (5,7 ммоль) соединения (VII) в 20 мл CH<sub>3</sub>COOH добавляли 1,08 г (5,7 ммоль) моногидрата *n*-толуолсульфокислоты, перемешивали до растворения и выдерживали 5 ч при 20° С, затем упаривали при 25° С и закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 5,2 г (93%), т. пл. 185–187° С.  $[\alpha]_D^{20}$  –24° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,15 (Б), 0,52 (Г), 0,15 (Ж).

*Woc-Met-* *Z-Lys-Gln-Phe-Phe-Gly-OBu<sup>t</sup> (IX)*. К раствору 5,2 г (5,3 ммоль) соединения (VIII) в 25 мл DMF добавляли 2,3 г (5,5 ммоль) Woc-Met-ONp и 0,9 мл (5,3 ммоль) DIPEA. Выдерживали 60 ч при 20° С, затем реакционную смесь упаривали и остаток закристаллизовывали растиранием с эфиром, затем перемешивали со 100 мл воды, фильтровали, сушили над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Выход 5,2 г (90%), т. пл. 190–192° С.  $[\alpha]_D^{20}$  –25° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,11 (А), 0,70 (З).

*H-Met-* *Z-Lys-Gln-Phe-Phe-Gly-OH · 1,5BF<sub>3</sub> · CH<sub>3</sub>COOH (X)*. К раствору 5,0 г (4,17 ммоль) соединения (IX) в 20 мл CH<sub>3</sub>COOH добавляли 2,7 мл (24 ммоль) эфира трифтористого бора и выдерживали 8 ч при 20° С. Затем реакционную смесь упаривали в вакууме при 0° С, оставшееся масло растирали с безводным эфиром. При этом образовался белый кристаллический осадок, который отфильтровывали, растворили в 2,5 мл CH<sub>3</sub>COOH и выдерживали 3 ч при 60° С. Затем упаривали и остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 4,4 г (87%). ЯМР-спектр на ядрах <sup>11</sup>B: 0,0; 0,74 м.д. Т. пл. 215–220° С.  $[\alpha]_D^{20}$  –4,0° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,40 (В), 0,32 (Г). E<sub>nis</sub> 0,53 (1 п. CH<sub>3</sub>COOH).

*Woc-Phe-Gly-OBzl (XI)*. 12,0 г (31,2 ммоль) Woc-Phe-ONp и 10,0 г (29,6 ммоль) H-Gly-OBzl-TosOH [23] растворяли в 40 мл DMF и добавляли 3,26 мл (29,6 ммоль) *N*-метилморфолина. Выдерживали 20 ч при 20° С, упаривали, остаток встряхивали со смесью 100 мл 2% KHSO<sub>4</sub> и 100 мл эфира. Образовавшийся кристаллический осадок отфильтровывали, промывали его на фильтре водой, высушивали при 1 мм рт. ст. в присутствии P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Выход 11,6 г (84%). Т. пл. 133–133,5° С (134–135° С [23]).  $[\alpha]_D^{20}$  –6,9° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,64 (А), 0,70 (И). Найдено, %: С 66,57; Н 6,97; N 6,95. C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Вычислено, %: С 66,79; Н 6,84; N 6,79.

*H-Phe-Gly-OBzl-CF<sub>3</sub>COOH (XII)*. 10,0 г (24,2 ммоль) соединения (XI) растворяли в 30 мл CF<sub>3</sub>COOH. Выдерживали 30 мин при 20° С, упаривали при этой температуре, маслообразный остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром, фильтровали, осадок высушивали при 1 мм рт. ст. в присутствии KOH. Выход 9,5 г (92%). Т. пл. 118–120° С.  $[\alpha]_D^{20}$  +14,8° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,46 (Г), 0,39 (Д). E<sub>nis</sub> 0,69 (1 п. CH<sub>3</sub>COOH). Найдено, %: С 56,59; Н 4,97; N 6,51; F 11,88. C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>. Вычислено, %: С 56,34; Н 4,97; N 6,57; F 13,37.

*Woc-Phe-Phe-Gly-OBzl (XIII)*. Получали из Woc-Phe-ONp и соединения (XII) аналогично синтезу соединения (IX). Выход 94%. Т. пл. 138,5–139,5° С (139–141° С [24]).  $[\alpha]_D^{20}$  –14,2° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,61 (А), 0,64 (И). Найдено, %: С 69,05; Н 6,88; N 7,68. C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено, %: С 68,68; Н 6,66; N 7,51.

*H-Phe-Phe-Gly-OBzl-CF<sub>3</sub>COOH (XIV)*. Получали из соединения (XIII) аналогично синтезу соединения (XII). Выход после некристаллизации из воды 83%. Т. пл. 189,5–190,5° С.  $[\alpha]_D^{20}$  +5,4° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,77 (Г), 0,60 (Д). E<sub>nis</sub> 0,56 (1 п. CH<sub>3</sub>COOH). Найдено, %: С 60,91; Н 5,16; N 7,29. C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>F<sub>3</sub>. Вычислено, %: С 60,73; Н 5,27; N 7,33.

*Woc-Gln-Phe-Phe-Gly-OBzl (XV)*. Получали из Woc-Gln-ONp и соединения (XIV) аналогично синтезу соединения (XI). При обработке вместо эфира использовали этилацетат. Выход 93%. Т. пл. 212–213° С (214–216° С [24]).  $[\alpha]_D^{20}$  –18,0° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,31 (А), 0,43 (И). Найдено, %: С 64,58; Н 6,67; N 10,22. C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>. Вычислено, %: С 64,61; Н 6,74; N 10,18.

*H-Gln-Phe-Phe-Gly-OBzl-CF<sub>3</sub>COOH (XVI)*. Получали из соединения (XV) аналогично синтезу соединения (XII). Выход 94%. Т. пл. 154–155° С.  $[\alpha]_D^{20}$  +7,3° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,48 (Г), 0,43 (Д). E<sub>nis</sub> 0,51 (1 п. CH<sub>3</sub>COOH). Найдено, %: С 57,15; Н 5,49; N 9,80. C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>F<sub>3</sub>. Вычислено, %: С 58,20; Н 5,46; N 9,98.

*H-Gln-Phe-Phe-Gly-OH-CF<sub>3</sub>COOH (XVII)*. Получали гидрированием соединения (XVI) в метаноле аналогично синтезу соединения (IV). Выход 97%. Т. пл. 210–212° С.  $[\alpha]_D^{20}$  –20,1° (с 1, DMF). R<sub>f</sub> 0,38 (Г), 0,24 (Д). E<sub>nis</sub> 0,50 (1 п. CH<sub>3</sub>COOH).

*Woc-Met-* *Z-Lys-OH · DCHA (XVIII)*. 6,0 г (21,6 ммоль) Z-Lys-OH [25] суспендировали в 100 мл DMF, добавляли 9,0 г (21,6 ммоль) Woc-Met-OPfp [21] и 3,7 мл (21,6 ммоль) DIPEA. Перемешивали 10 ч при 20° С. Упаривали, маслянистый остаток растворяли в 200 мл хлороформа и полученный раствор промывали последовательно 100 мл 10% KHSO<sub>4</sub>, 100 мл 10% KHCO<sub>3</sub> и 100 мл воды, сушили безводным MgSO<sub>4</sub>,

фильтровали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 200 мл эфира и добавляли 4,3 гл (23,7 ммоль) дициклогексилamina. Образовавшийся кристаллический осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, высушивали. Выход 14,5 г (97%).  $[\alpha]_D^{20} -1,7^\circ$  (с 1, DMF).  $R_f$  0,40 (А), 0,19 (В).

*H-Met*-<sup>|</sup>—<sup>|</sup>*Z-Lys-OH-CF<sub>3</sub>COOH* (XIX). 11,5 г (16,6 ммоль) соединения (XVII) встряхивали со смесью 200 мл этилацетата и 200 мл 10%  $\text{KHSO}_4$  до растворения. Органический слой отделяли, сушили безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали, фильтрат упаривали. Маслянистый остаток растворяли в 20 мл смеси  $\text{CF}_3\text{COOH} - \text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:2) и выдерживали 5 ч при 20°С. Упаривали при 20°С, остаток растворяли с безводным эфиром. Образовавшийся осадок отфильтровывали и высушивали при 1 мм рт. ст. над  $\text{KOH}$ . Выход 8,5 г (98%).  $R_f$  0,49 (Г); 0,41 (Д).  $E_{\text{HPLC}} 0,49$  (1 н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ).

*Voc-Leu-Met*-<sup>|</sup>—<sup>|</sup>*Z-Lys-OH* (XX). 7,7 г (19,4 ммоль) *Voc-Leu-OPfp* [21] и 8,5 г (16,2 ммоль) соединения (XIX) растворяли в 200 мл этилацетата, добавляли 6,0 мл (35,6 ммоль) DIPEA и выдерживали 20 ч при 20°С. Экстрагировали 100 мл 10%  $\text{KHSO}_4$ , органический слой отделяли и использовали для хроматографического разделения на приборе Jobin Yvon Chromatospac Prep 10 (200 г силикагеля, элюент — хроматографическая система А). Фракции элюата, содержащие чистый пептид, объединяли, упаривали и остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 8,0 г (79%).  $[\alpha]_D^{20} -21,9^\circ$  (с 1, DMF).  $R_f$  0,42 (А), 0,31 (В).

*Voc-Leu-Met*-<sup>|</sup>—<sup>|</sup>*Z-Lys-OPfp* (XXI). 5,0 г (8,0 ммоль) соединения (XX) растворяли в 100 мл этилацетата, охлаждали до 0°С и добавляли 1,6 г (9,0 ммоль) пентафторфенола и 1,8 г (9,0 ммоль)  $\text{N,N}'$ -дициклогексилкарбодимида. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при 20°С, фильтровали, фильтрат упаривали. Остаток закристаллизовывали растиранием с гексаном, отфильтровывали и высушивали при 1 мм рт. ст. над  $\text{P}_2\text{O}_5$  и  $\text{KOH}$ . Выход 6,0 г (96%).  $[\alpha]_D^{20} -24,1^\circ$  (с 1, DMF).  $R_f$  0,50 (А), 0,41 (В).

*Voc-Leu-Met*-<sup>|</sup>—<sup>|</sup>*Z-Lys-Gln-Phe-Phe-Gly-OH* (XXII). *Первый синтез*. Получали из соединения (X) и *Voc-Leu-OPfp* [21] аналогично синтезу соединения (XI). Закристаллизовывали растиранием с эфиром. Выход 85%. Т. пл. 252–255°С.  $R_f$  0,13 (А), 0,58 (Ж), 0,23 (З). *Второй синтез*. Получали из эквивалентных количеств соединений (XVII) и (XXI) аналогично синтезу соединения (VII). Выход 96%. Т. пл. 252–254°С.  $[\alpha]_D^{20} -24^\circ$  (с 1, DMF).  $R_f$  0,13 (А), 0,58 (Ж), 0,23 (З).

*Voc-Leu-Met*-<sup>|</sup>—<sup>|</sup>*Z-Lys-Gln-Phe-Phe-Gly-OPfp* (XXIII). 1,0 г (0,9 ммоль) соединения (XXII) растворяли в 10 мл DMF, при 0°С добавляли 0,75 г (1,0 ммоль) комплекса  $\text{N,N}'$ -дициклогексилкарбодимида с пентафторфенолом (1:3) [26] и выдерживали 20 ч при 20°С. Затем реакционную смесь фильтровали, фильтрат упаривали, остаток растворяли с гексаном. Выход белого кристаллического вещества 1,1 г (99%). Т. пл. 180–182°С.  $R_f$  0,77 (А).

*H-Leu-Met*-<sup>|</sup>—<sup>|</sup>*Z-Lys-Gln-Phe-Phe-Gly-OPfp-CF<sub>3</sub>COOH* (XXIV). 1,0 г (0,78 ммоль) соединения (XXIII) растворяли в смеси 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и 2,5 мл  $\text{CF}_3\text{COOH}$ . Выдерживали 1 ч при 20°С, упаривали при этой температуре, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 1,0 г (99%). Т. пл. 218–222°С.  $R_f$  0,38 (Б), 0,85 (В).

*cyclo(Z-Lys-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met)* (Z-CLP). *Первый синтез*. К раствору 0,2 гл (1,16 ммоль) DIPEA в 500 мл диоксана (свежеперегнаный над натрием) при интенсивном перемешивании добавляли раствор 0,5 г (0,38 ммоль) соединения (XXIV) в 50 мл диметилсульфоксида. Выдерживали 3 сут при 20°С, упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Полученный продукт очищали хроматографически на приборе Jobin Yvon Chromatospac Prep 10 (200 г силикагеля, элюент — хроматографическая система З). Фракции элюата, содержащие предпологаемый циклопептид, объединяли и упаривали. Остаток закристаллизовывали растиранием с эфиром, высушивали, затем перемешивали с 3 мл воды и декантировали (2 раза). Сушили при 1 мм рт. ст. над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Выход 90 мг (24%).  $[\alpha]_D^{20} -26,2^\circ$  (с 1, метанол).  $R_f$  0,77 (А), 0,92 (Б), 0,30 (З). Амнокислотный анализ: Lys 1,09 (1), Glu 1,18 (1), Phe 2,0 (2), Gly 1,0 (1), Leu 1,0 (1), Met 0,84 (1). Данные масс-спектрометрии с десорбцией полей,  $m/z$ : 986 ( $M+H$ )<sup>+</sup>; 1008 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>; 1024 ( $M+K$ )<sup>+</sup>. *Второй синтез*. Проводили аналогично. Циклизацию 0,9 г (0,68 ммоль) соединения (XXIV) осуществляли в дважды переганном DMF. Очистку проводили на 3 г силасорба 600 (зерчение 30 мкм, ЧССР), помещенного на пористый фильтр диаметром 2,5 см. На слой носителя наносили раствор продукта синтеза в 50 мл хлороформа, затем силасорб медленно промывали хроматографической системой А. Собирали фракции элюата по 20 мл, их исследовали с помощью ТСХ, объединяли те из них, которые содержали чистый циклопептид. Выход 0,45 г (43%).  $[\alpha]_D^{20} -25,7^\circ$  (с 1, метанол). Т. пл. 244–246°С. Хроматографические свойства продуктов обоих синтезов одинаковы.

*cyclo(H-Lys-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met)-CH<sub>3</sub>COOH* (CLP). *Первый вариант*. 60 мг (0,06 ммоль) Z-CLP растворяли в смеси 9,6 мл метанола и 0,4 мл  $\text{HCOOH}$  и перемешивали 12 ч в присутствии Pd-черни (спустя 5 ч после начала гидрирования меняли катализатор). Фильтровали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 5 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и упаривали (3 раза), а затем закристаллизовывали растиранием с безводным эфи-



ром. Полученный продукт очищали хроматографически на колонке (1,4×22 см) с силикагелем (Merck, Lobar, Size A), элюент — хроматографическая система Г. Фракции элюата, содержащие чистый CLP, объединяли, упаривали, остаток растворяли в 2 мл воды, фильтровали и фильтрат лиофилизировали. Получили белый порошок. Выход 20 мг (36%).  $[\alpha]_D^{20}$  -46,0° (с 1, метанол).  $R_f$  0,16 (B), 0,45 (Г).  $E_{215}^{1\%}$  0,46 (5 н.  $Cl_2COOH$ ). Амнокислотный анализ: Lys 1,02 (1), Glu 1,17 (1), Phe 2,07 (2), Gly 1,04 (1), Leu 1,05 (1), Met 0,85 (1). При расщеплении препарата химотрипсином образуется лишь один продукт. *Второй вариант.* Проводили аналогично, но без хроматографической очистки (в ней не было необходимости, так как чистота вещества удовлетворительна, рис. 1). Выход 75%. Т. пл. 162–163° С.  $[\alpha]_D^{20}$  -46,8° (с 1, метанол). Хроматографические и электрофоретические характеристики продуктов обоих синтезов совпадают.

*Определение миотропной активности* проведено на изолированной подвздошной кишке морской свинки. Регистрацию изотопических сокращений проксимального участка кишки производили при использовании прибора ВИ 6-5 МА в модификации. Агонистические свойства CLP и Z-CLP изучены в диапазоне концентраций  $10^{-11}$ – $10^{-5}$  М. Параметры  $\alpha$  и  $pD_2$  рассчитаны по кумулятивной кривой «концентрация — эффект» (рис. 2).

*Определение прессорной активности.* Белые крысы обоего пола массой 180–200 г наркотизировали уретаном внутривенно из расчета 1,25 г на 1 кг массы животного. Соединения вводили в бедренную вену в виде инъекций объемом 0,1 мл (груднорастворимое Z-CLP растворяли в минимальном объеме этанола и разводили физиологическим раствором). Артериальное давление регистрировали в общей сонной артерии с помощью трансдюсера Gould-Statham P 2310 на регистрирующем приборе Nilon Kochden. Испытаны дозы от 50 нмоль до 50 мкмоль на 1 кг массы животного.

Для определения влияния CLP на центральную нервную систему мышей использовали тест плаванья по Порсольту [20]. В качестве подопытных животных применяли беснородных самок массой 18–26 г. Пептиды растворяли в физиологическом растворе из расчета 0,1 мл на 10 г массы животного и вводили внутривенно за 30 мин до тестирования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Эме П., Бинерт М., Хехт К., Бергман Ю. // Вещество Р. Некоторые проблемы химии, биохимии, фармакологии, физиологии и патофизиологии. Рига: Зинатне, 1984. С. 1–148.
2. Эме П. // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1984. № 3. С. 57–59.
3. Chipens G. I., Mutulis F. K., Myshlyakova N. V., Misina I. P., Vitolina R. O., Klusha V. E., Kalayev B. S. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1985. V. 26. № 5. P. 460–468.
4. Chipens G. I., Ancans J., Berga D., Vosekalna I., Mishlyakova N., Krikis A. // Chemistry of Peptides and Proteins. V. 2. /Eds Voelter W., Bayer E., Ovchinnikov Yu. A., Wünsch E. B.—N. Y.: Walter de Gruyter, 1984. P. 261–266.
5. Лиенкаула П. К., Скуньш А. А., Романовский П. Я., Порункевич Е. А., Раткевич М. П., Восекална И. А., Гайлите Е. А., Чипенс Г. И. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 9. С. 1157–1166.
6. Hruby V. J. // Life Sci. 1982. V. 31. № 3. P. 189–200.
7. Никифорович Г. В., Балодис Ю. Ю., Чипенс Г. И. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 5. С. 645–654.
8. Neubert K., Mansfeld H.-D., Hartrodt B., Berger E., Jakubke H.-D., Bergmann J., Mehlis B. // Peptides 1978/Eds Kupryszewski G., Siemion I. Wrocław: Univ. Press, 1979. P. 455–459.
9. Neubert K., Mansfeld H.-W., Jakubke H.-D., Bergmann J. // Pharmazie. 1979. V. 34. № 5/6. P. 347–349.
10. Jakubke H., Neubert K., Hartrodt B., Mansfeld J., Bergmann J., Mehlis B. Пат. ГДР, DD 201, 024, 1983.
11. Chassaing G., Lavielle S., Ploux O., Julien S., Convert O., Marquet A., Beaujouan J. C., Torrens Y., Glowinski J. // Peptides 1984/Ed. Ragnarsson U. Stockholm: Almqvist & Wiksell International, 1984. P. 345–348.
12. Theodoropoulos D., Poulos C., Gatos D., Cordopatis P., Escher E., Mizrahi J., Regoli D., Dalicost D., Furst A., Lee T. D. // J. Med. Chem. 1985. V. 28. № 10. P. 1536–1539.
13. Darman P. S., Landis G. C., Smith J. R., Hirning L. D., Gulya K., Yamamura H. I., Burka T. F., Hruby V. J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 127. № 2. P. 656–662.
14. Sandberg B. E. B., Bishai W. R., Hannah P. // Peptides 1984/Ed. Ragnarsson U. Stockholm: Almqvist & Wiksell International, 1984. P. 369–372.
15. Chipens G., Mutulis F., Grinsteine I., Maurops G., Vegners R., Lenska G. // 17-th Eur. Pept. Symp. Abstr. Prague, 1982. P. 411.
16. Голубева В. В., Кукайн Э. М., Свирскис Ш. В., Муцениеце Р. К., Мутуле И. Э., Мауронс Г. Х., Клауша В. Е. // Тез. конф. «Актуальные вопросы разработки, изучения и производства лекарственных средств». Каунас. 1985. С. 218–219.
17. Мутулис Ф. К., Мутуле И. Э., Мауронс Г. Х., Секацис Н. Ш., Григорьева В. Д., Кукайн Э. М., Голубева В. В., Мышлякова Н. В., Клауша В. Е., Чипенс Г. И. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 9. С. 1276–1278.

18. *Chassaing G., Convert O., Lavielle S.* // Eur. J. Biochem. 1986. V. 154. № 1. P. 77–85.
19. *Bienert M., Lebl M., Mehlis B., Niedrich H.* // Peptides 1980/Ed. Brunfeld K. Copenhagen: Scriptor, 1981. P. 127–132.
20. *Porsolt R. D., Bertin A., Jalfre M.* // Arch. int. pharmacodyn. et thèr. 1977. V. 229. P. 327–330.
21. *Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I.* // Lieb. Ann. 1973. B. 9. S. 1421–1429.
22. *Anderson G. W., Callahan F. M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1960. V. 82. № 13. P. 3359–3363.
23. *Deternann H., Zipp O., Wieland T.* // Lieb. Ann. 1962. B. 651. S. 172–184.
24. *Jakubke H.-D., Klessen Ch., Neubert K.* // J. Prakt. Chem. 1977. B. 319. № 4. S. 640–646.
25. *Scott J. W., Parker D., Parrish D. R.* // Synth. Commun. 1981. V. 11. № 4. P. 303–314.
26. *Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1967. V. 89. № 1. P. 183–184.

Поступила в редакцию

21.X.1986

После доработки

27.I.1987

## CYCLIC ANALOGUES OF SUBSTANCE P. I. CYCLO(11→5<sup>E</sup>)-[Lys<sup>5</sup>] SUBSTANCE P-(5–11)

MAUROPS G., MUTULIS F., ROZITE S., MYSHLYAKOVA N.,  
SVIRSKIS S., KLUSA V., CHIPENS G.

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

Two solution syntheses of cyclo(11→5<sup>E</sup>)-[Lys<sup>5</sup>]substance P-(5–11) (CLP) were carried out. The first synthesis involved the stepwise elongation of the peptide chain starting from glycine *tert*-butyl ester. At the stage of hexapeptide deprotection, the cleavage of Boc and Bu<sup>t</sup> groups was accompanied by *tert*-butylation of the Met residue. Cyclization was carried out via a pentafluorophenyl ester intermediate. The benzyloxycarbonyl-cyclopeptide (Z-CLP) formed was deprotected by catalytic transfer hydrogenation. A (3+4) block coupling strategy was used in course of the repeated preparation of the linear precursor of CLP. Optimization of the cyclization and subsequent deprotecting stages lead to increased yields and facilitated the synthetic procedure. Z-CLP was found to possess myotropic activity on isolated guinea pig ileum ( $\alpha = 0,55 \pm 0,18$ ;  $pD_2 = 7,97 \pm 0,20$ ), whereas CLP was inactive in these experiments. Z-CLP causes a slight two-phase effect on arterial pressure in rats, CLP being inactive. Similar to substance P, CLP displays an antidepressant-like effect in mice as indicated by the swimming test.