



УДК 577.175.853'17:547.964.4.057

ЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ДЕЗ-Arg⁹-[Leu⁸]БРАДИКИНИНА

*Мутуле И. Э., Мутулис Ф. К., Розите С. Х.,
Порункевич Е. А., Раткевич М. П., Мышлякова Н. В.,
Индулес Ю. И., Клуша В. Е., Чипенс Г. И.*

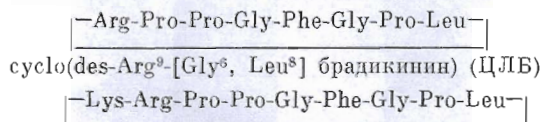
Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Классическими методами пептидной химии синтезированы четыре циклических производных брадикинина и каллидина. Для образования пептидных связей, включая реакцию циклизации, применяли метод пентафторфениловых эфиров. Замыкание цикла осуществляли в разбавленном растворе диоксана с выходом ~40%. Защитные группы снимали обработкой фтористым водородом в присутствии анизола. Конечные продукты очищали капельной противоточной хроматографией. Установлено, что полученные циклокинины обладают селективным действием. Подобно линейному брадикинину они высвобождают гистамин из тучных клеток, но лишены миотропной и депрессорной активности.

В последние годы резко возрос интерес к циклическим производным линейных природных пептидов. Циклизация значительно снижает конформационную подвижность пептидной цепи и способствует образованию более устойчивых вторичных структур. Таким образом, появляется возможность исследования как бы аналогов отдельных конформеров природного пептида. При этом, как правило, наблюдается сужение спектра биологического действия биорегулятора; у циклоаналогов характерная для природного соединения активность в некоторых тестах не проявляется, а в других сохраняется и даже увеличивается. Это позволяет получить сведения о зависимости «конформация — активность» для различных типов рецепторов одного и того же биорегулятора [1].

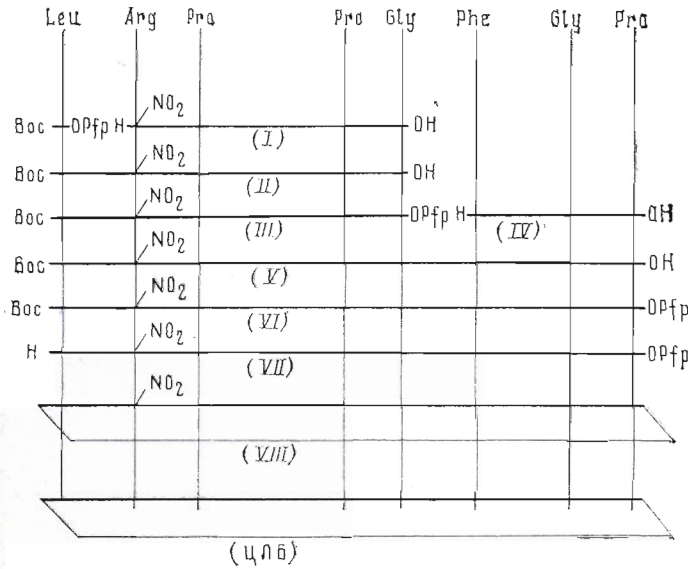
Нами синтезированы и всесторонне изучены циклические аналоги брадикинина и каллидина. Показано, что вторичная структура некоторых из них очень близка конформации природного гормона [2]. Установлено, что и брадикинин, и cyclo(9→1⁶)[Lys¹, Gly⁶]брадикинин в диметилсульфоксиде содержат β-изгиб в районе -Pro-Pro-Gly-Phe-. В молекуле брадикинина обнаружена внутримолекулярная поппная связь между терминальными амино- и карбоксильной группами, которая замыкает структуру, напоминаящую циклопептид [3].

Циклические аналоги брадикинина обладают своеобразными биологическими свойствами. Они отличаются пролонгированным гипотензивным эффектом с выраженной видовой специфичностью [4] и превосходят брадикинин по способности высвобождать гистамин из тучных клеток [5]. Для изучения зависимости этого эффекта от структурных особенностей аналогов брадикинина (введения остатка лейцина вместо остатка фенилаланина, количества положительных зарядов, их расположения и размера цикла, а также замены остатка серина на остаток глицина) мы предприняли синтез четырех циклических аналогов брадикинина и каллидина:



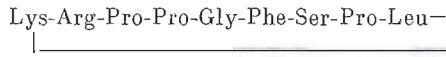
Принятые сокращения: DMF — N,N-диметилформамид, Pfr — пентафторфенил, Tcr — 2,3,5-трихлорфенил, ЦГК — cyclo(des-Arg¹⁰-[Gly⁷, Leu⁹]каллидин), ЦЛБ — cyclo(des-Arg⁹-[Gly⁶, Leu⁸]брадикинин), ЦЛК — cyclo(9→1⁶)(des-Arg¹⁰-[Leu⁹]каллидин), ЦОК — cyclo(9→1⁶)(des-Arg¹⁰-[Orn⁴, Leu⁹]каллидин).

Схема 1

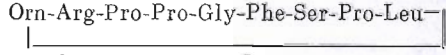


Синтез cyclo(des-Agr²-[Gly⁶, Leu⁸]брадикинина) (ЦЛБ)

cyclo(des-Arg¹⁰-[Gly⁷, Leu⁹] каллидин) (ЦГК)



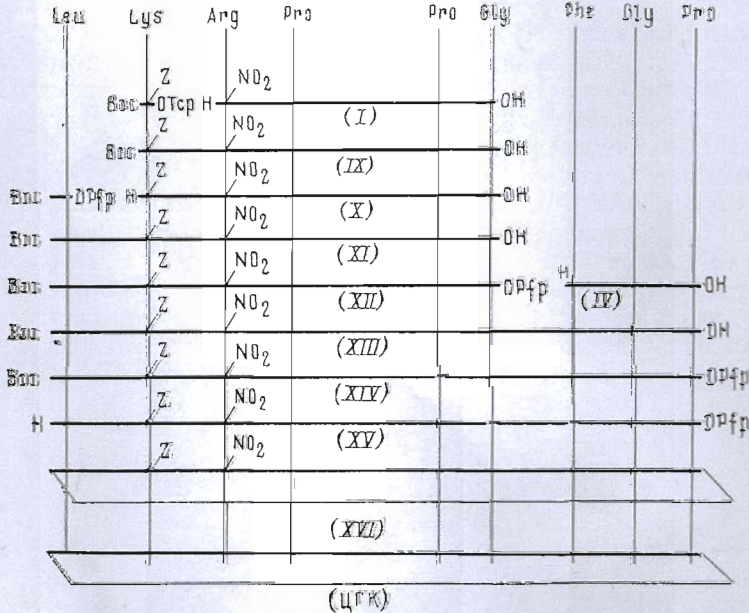
cyclo(9 → 1^ε)(des-Arg¹⁰-[Leu⁹] каллидин) (ЦЛК)



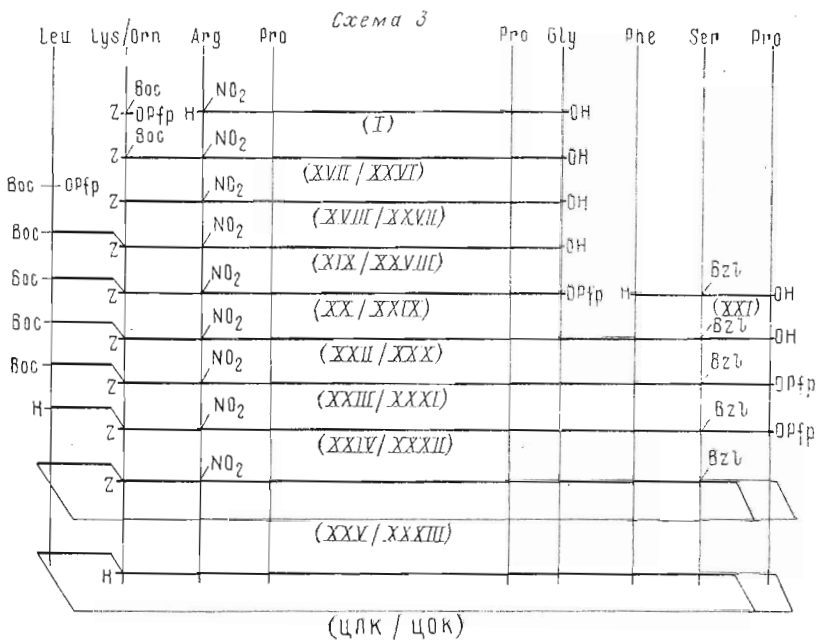
cyclo(9 → 1^δ)(des-Arg¹⁰-[Orn¹, Leu⁹] каллидин) (ЦОК)

Линейные предшественники циклопептидов синтезировали методами классической пептидной химии в растворе с использованием блочной конденсации (схемы 1—3). Промежуточные продукты (I), (IV) и (XXI), описанные ранее [6], применялись для синтеза нескольких циклопептидов.

Схема 2



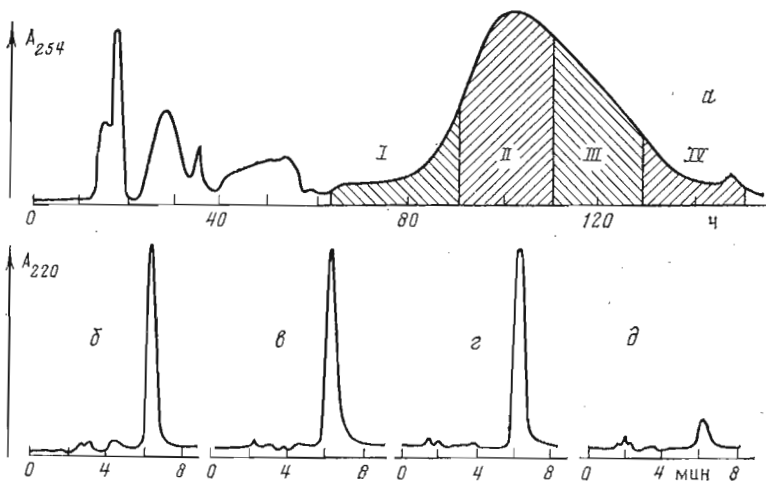
Синтез cyclo(des-Arg¹⁰-[Gly⁷, Leu⁹] каллидина) (ЦГК)



Синтез cyclo(9→16) (des-Arg¹⁰-[Leu⁹]каллидина) (ЦЛК) и cyclo(9→16)-
(des-Arg¹⁰-[Orn¹, Leu⁹]каллидина) (ЦОК)

Временную защиту аминофункций обеспечивали *tert*-бутилоксикарбонильной группой, постоянную защиту остатка лизина — бензилоксикарбонильной группой, гуанидиновую функцию аргинина — нитрогруппой, С-концевую карбоксильную группу аминокомпонента — солеобразованием. Удаление *tert*-бутилоксикарбонильной защиты осуществляли обработкой трифторуксусной кислотой. Для образования пептидных связей, включая циклизацию, применяли метод пентафторфениловых эфиров.

Циклизация осуществлена в разбавленном растворе диоксана, образовавшиеся циклопептиды выделены хроматографией на силикагеле с выходом ~40%. Для идентификации этих соединений криоскопически с использованием расплава мочевины [7] определена их молекулярная масса; полученные данные подтверждают мономерное строение веществ. Затем обработкой безводным фтористым водородом в присутствии анизола удалили защитные группы, полученный пептид перевели в ацетатную форму обработкой ионообменной смолой и очистили капельной противоточной



Выделение ЦЛК. Профиль элюции ЦЛК (198 мг) при капельной противоточной хроматографии (150 трубочек, производительность 3,8 мл/ч) (а), а также аналитическая ВЭЖХ выделенных при этом фракций I (11 мг, б), II (87 мг, в), III (38 мг, г), IV (37 мг, д)

хроматографией [8] (рисунок). Строение конечных продуктов подтверждено данными масс-спектрометрии с десорбцией полевом. При расщеплении их трипсином или химотрипсином в начале обработки образуется лишь одно новое вещество, что свидетельствует о циклической структуре молекулы. Элементный анализ ЦЛК, ЦГК и ЦОК показал, что их молекулы гидратированы.

С целью определения оптической чистоты в случае ЦОК выполнено стереоспецифическое окисление гидролизата в присутствии оксидазы *L*-аминокислот из яда гремучей змеи [9]; *D*-изомеров Arg, Phe, Ser и Leu не обнаружено. Как известно, Orn и Pro в данных условиях не окисляются [10], и поэтому проверить их оптическую чистоту этим методом нельзя. Однако нет основания предполагать их рацемизацию в процессе синтеза.

Изучена способность синтезированных соединений вызывать секрецию гистамина из перитонеальных тучных клеток крысы. Тучные клетки получали по методу [11] с некоторыми модификациями. Содержание гистамина определяли спектрофлуориметрически [12]. Установлено, что все четыре циклопептида обладают гистаминвысвобождающей активностью, подобной действию брадикинина (EC_{50} *: брадикинин (стандарт) $1,36 \cdot 10^{-5}$, ЦЛБ $3,62 \cdot 10^{-5}$, ЦГК $6,17 \cdot 10^{-6}$, ЦЛК $1,25 \cdot 10^{-5}$, ЦОК $2,57 \cdot 10^{-5}$ М).

Проводились также опыты по определению миотропной активности циклопептидов *in vitro* на матке крысы [13]. Концентрация соединений составила 10^{-10} — 10^{-5} М. Показано, что изучаемые вещества не обладают миотропным действием и не влияют на эффект брадикинина. Отрицательный результат дало также испытание циклопептидов *in vivo* на воздействие на артериальное давление крысы.

Таким образом, установлено, что циклические производные дез-Arg⁹-[Leu⁸]брадикинина обладают селективным биологическим действием, сочетая отсутствие вазоактивности и миотропного эффекта со способностью высвобождать гистамин из тучных клеток крысы.

Учитывая полученные данные по гистаминвысвобождающей активности *cislo*(10→1⁶)каллидина (EC_{50} $5,46 \cdot 10^{-8}$ М) и *cislo*(9→1⁶) ([Lys¹, Gly⁶]брадикинина) (EC_{50} $2,13 \cdot 10^{-7}$ М) [5], можно сделать следующие выводы: 1) удаление остатка Arg⁹ и замена остатка Phe⁸ на Leu в циклических аналогах брадикинина приводит к уменьшению гистаминвысвобождающей активности на 2—3 порядка и к полному исчезновению вазоактивности и миотропного действия; 2) гистаминвысвобождающий эффект уменьшается также при уменьшении размера цикла и сокращения числа положительных зарядов в молекуле; 3) замена остатка Ser⁶ на Gly, по видимому, существенно не влияет на секрецию гистамина.

Экспериментальная часть

Для синтеза использовали производные аминокислот, поставляемые фирмой Reanal (Венгрия) и «Союзреактив» (СССР). Все аминокислоты, кроме глицина, имеют *L*-конфигурацию. Упаривание проводилось на вакуумном ротационном испарителе при 30° С. Температуры плавления, которые определяли в открытых капиллярах, приведены без исправления. Индивидуальность полученных соединений проверялась с помощью ТСХ на пластинках Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60F₂₅₄ (ФРГ). Приведены хроматографические подвижности R_f на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системах: хлороформ — этанол — этилацетат — уксусная кислота — вода, 85 : 5 : 8 : 2 : 0,25 (А); система А — изопропанол, 4 : 1 (Б); хлороформ — этанол — этилацетат — *n*-бутанол — вода, 10 : 6 : 3 : 4 : 1 (В); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5, верхняя фаза (Г); хлороформ — уксусная кислота — вода, 41 : 27 : 6 (Д). Электрофорез осуществлялся в нестандартном приборе (напряжение 600 В, градиент потенциала 15,8 В/см, время 1 ч) на бумаге FN-16 (ГДР) в 1 М уксусной кислоте (приведена подвижность относительно гистидина (E_{H15})). На хро-

* Концентрация пептида, при которой высвобождается половина всего гистамина, способного выделиться из образца тучных клеток.

матограммах вещества обнаруживались в УФ-свете, а также с помощью пингидрина, реакции Сакагучи или хлор-бензидина.

Строение соединений подтверждалось ПМР-спектроскопией. Спектры получены на приборе Bruker WH-90 (ФРГ), химические сдвиги, форма и интенсивность сигналов соответствовали предполагаемому строению пептидов. Масс-спектры получены на приборе Varian Mat CH-5, снабженном комбинированным источником ионов (EI-FI-FD). Аминокислотный анализ выполняли на анализаторе Bioscal BC-200 (ФРГ) после 24-часового гидролиза пептидов 5,7 н. HCl в запаянной ампуле при 110° С. Аналитическая ВЭЖХ осуществлялась на приборе Du Pont 830 (США), приведен коэффициент емкости k' на носителе Zorbax ODS, элюент — CH₃CN — 0,1 М КН₂РO₄ (+Н₃РO₄ до рН 2,4), 3 : 7. Хроматографическую очистку проводили на приборе Jobin Yvon Chromatospac Prep 10 (Франция; размер колонки 4×35 см) с использованием силикагеля Н 60 (Merck, ФРГ). Капельная противоточная хроматография осуществлена на приборе DCC-A Токуо Rikakikai Ltd. (Япония), в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5), подвижная фаза — верхняя. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer 141 (Швеция).

Boc-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH (II). К раствору 4,0 г (6,8 ммоль) Н-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH (I) [6] и 2,78 г (7,0 ммоль) Boc-Leu-OPfp [14] в 150 мл безводного СН₂Cl₂ добавляли 2,33 мл (13,6 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина и выдерживали 12 ч при 20° С. Реакционную смесь промывали 100 мл 2% КНСO₄, 100 мл воды, сушили NaSO₄. Фильтровали, фильтрат упаривали, остаток закристаллизовали растиранием с безводным эфиром. Выход соединения (II) 2,60 г (56%). Т. пл. 118—125° С. $[\alpha]_D^{20}$ —58,0° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,05 (Б), 0,06 (В), 0,46 (Г).

Boc-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OPfp (III). К раствору 2,60 г (3,8 ммоль) соединения (II) в 100 мл безводного СН₂Cl₂ добавляли 0,70 г (3,8 ммоль) пентафторфенола, охлаждали до 0° С и добавляли раствор 0,78 г (3,8 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида в 25 мл СН₂Cl₂. Выдерживали 24 ч при 0° С. Фильтровали, фильтрат упаривали. Маслянистый остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход соединения (III) 2,85 г (91%). Т. пл. 95—100° С (с разл.), $[\alpha]_D^{20}$ —52,7° (с 1, DMF). R_f 0,19 (А), 0,58 (Б), 0,79 (В), 0,80 (Г).

Boc-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-OH (V) синтезировали из соединения (III) и Н-Phe-Gly-Pro-OH (IV) [6] в присутствии N,N-диизопропилэтиламина аналогично получению соединения (II), растворяли в СНCl₃ и использовали для хроматографической очистки (элюировали системой Б). Фракции элюата, содержащие, по данным ТСХ, чистый предполагаемый октапептид, объединяли, упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход соединения (V) 97%. $[\alpha]_D^{20}$ —55,1° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,05 (Б), 0,11 (В), 0,46 (Г).

Boc-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-OPfp (VI). К раствору 3,31 г (3,3 ммоль) соединения (V) в 100 мл безводного СН₂Cl₂ добавляли 3,75 г (4,9 ммоль) комплекса N,N'-дициклогексилкарбодиимида и пентафторфенола (1 : 3) [15] и перемешивали 12 ч при 20° С. Фильтровали, фильтрат упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выдерживали в вакууме при 1 мм рт. ст. в присутствии КОН. Выход соединения (VI) 3,72 г (98%). Т. пл. 132—137° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20}$ —44,5° (с 1, DMF). R_f 0,07 (А), 0,42 (Б), 0,66 (В), 0,67 (Г).

H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-OPfp-CF₃COOH (VII). 3,72 г (3,2 ммоль) соединения (VI) растворяли в 60 мл смеси CF₃COOH—СН₂Cl₂ (1 : 1) и выдерживали 1 ч при 20° С. Упаривали при 20° С, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выдерживали в вакууме при 1 мм рт. ст. в присутствии КОН. Выход соединения (VII) 3,70 г (99%). Т. пл. 125—135° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20}$ —36,0° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0 (Б), 0 (В), 0,28 (Г).

Cyclo[-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Leu-] (VIII). 2,6 г (2,2 ммоль) соединения (VII) растворяли в 50 мл свежеперегнанного DMF и разбавляли 2,5 л свежеперегнанного над Na диоксана. Добавляли 4,15 мл

(6,6 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина и выдерживали 48 ч при 20° С. Упаривали, остаток растворяли в 200 мл CHCl_3 и промавали 10% KHSO_4 (100 мл) и 100 мл воды, сушили Na_2SO_4 , фильтровали. Фильтрат использовали для хроматографической очистки. Элюировали системой А (4 л), затем системой Б (2 л). Фракции элюата, содержащие, по данным ТСХ, чистый предполагаемый циклопептид, объединяли, упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход соединения (VIII) 0,75 г (39%). Т. пл. 207–230° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20} - 87,1^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,02 (А), 0,26 (Б), 0,42 (В), 0,43 (Г). Мол. масса: найдено криоскопически [7] 1064, вычислено 867.

Cyclo(-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Leu)-CH₃COOH (ЦЛБ). В прибор для работы с безводным HF (Protein Research Foundation, Япония) помещали 0,46 г (0,53 ммоль) соединения (VIII) и 1,0 мл анизола, туда же конденсировали 10 мл HF, перемешивали до растворения и выдерживали 1 ч при 20° С. Упаривали при помощи тефлонового водоструйного насоса, остаток выдерживали 10 ч в эксикаторе при 20 мм рт. ст. в присутствии KOH и H_2SO_4 . Образовавшийся маслянистый остаток растворяли в смеси 30 мл воды и 10 мл эфира. Органическую фазу отделяли, а водную обрабатывали 1 ч 3 г ионообменной смолы Amberlite IR-4B (Serva, ФРГ) в ацетатной форме. Фильтровали, на фильтре смолу промывали 50 мл воды, объединенный фильтрат упаривали. Образовался стеклообразный продукт (380 мг). Половину этого вещества растворяли в 5 мл хроматографической системы Г и очищали капельной противоточной хроматографией (270 трубочек, производительность 1,1 мл/ч). Детектировали при 254 нм, собирали одну фракцию элюата за 99 мин. Продолжительность разделения 10 сут. На диаграмме самописца обнаружился пологий максимум, отвечающие ему фракции 34–66, 67–90, 91–110 и 111–115 объединяли, упаривали, остаток растворяли в воде и лиофилизовали. Полученные продукты исследовали по ВЭЖХ. Установлено, что чистый циклопептид находится во фракциях 67–90 (45 мг) и 91–110 (67 мг). Выход ЦЛБ 48%. $[\alpha]_D^{20} - 97,0^\circ$ (с 1, вода). R_f 0 (В), 0,31 (Г), 0,47 (Д). E_{HIS} 0,35, k' 3,98. Расщепление химотрипсином [16] дает только один продукт. Данные масс-спектрометрии с десорбцией полем, m/z : $(M+H)^+$ 822, $(M+Na)^+$ 844. Аминокислотный состав: Arg 1,04 (1), Pro 2,94 (3), Gly 1,92 (2), Phe 0,99 (1), Leu 0,99 (1).

Woc-Lys(Z)-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH (IX) синтезировали из Woc-Lys(Z)-OTcp [17] и соединения (I) аналогично получению соединения (II) с выходом 89%. Т. пл. 103–113° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20} - 48,8^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,08 (Б), 0,09 (В), 0,49 (Г).

H-Lys(Z)-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH-CF₃COOH (X) синтезировали из соединения (IX) аналогично получению соединения (VII) с выходом 91%. Т. пл. 93–113° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20} - 39,4^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0 (Б), 0 (В), 0,29 (Г), E_{HIS} 0,50.

Woc-Leu-Lys(Z)-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH (XI) синтезировали из Woc-Leu-OPfp [14] и соединения (X) аналогично получению соединения (II) с выходом 86%. Т. пл. 115–130° С. $[\alpha]_D^{20} - 45,2^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,09 (Б), 0,11 (В).

Woc-Leu-Lys(Z)-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OPfp (XII) синтезировали из соединения (XI) аналогично получению соединения (III) с выходом 85%. Т. пл. 50–60° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20} - 41,0^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,13 (А), 0,58 (Б), 0,91 (В), 0,81 (Г).

Woc-Leu-Lys(Z)-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-OH (XIII) синтезировали из соединений (XII) и (IV) аналогично получению соединения (II). Продукт растворяли в CHCl_3 и очищали хроматографически (элюировали системой Б). Фракции, содержащие частично очищенный пептид, объединяли, упаривали. Остаток снова очищали, используя элюент *n*-бутанол – этилацетат – CH_3COOH – вода (4 : 2 : 0,2 : 0,3). Фракции элюата, содержащие чистый нонапептид, объединяли, упаривали и закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход соединения

(XIII) 27%. Т. пл. 131–144° С. $[\alpha]_D^{20}$ –57,5° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,07 (Б), 0,11 (В), 0,54 (Г).

Boc-Leu-Lys(Z)-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-OPfp (XIV) синтезировали из соединения (XIII) аналогично получению соединения (VI) с выходом 99%. Т. пл. 141–151° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20}$ –44,0° (с 1, DMF). R_f 0,05 (А), 0,46 (Б), 0,72 (В), 0,73 (Г).

H-Leu-Lys(Z)-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-OPfp-CF₃COOH (XV) синтезировали из соединения (XIV) аналогично получению соединения (VII) с выходом 99%. Т. пл. 110–125° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20}$ –32,3° (с 0,5, DMF). R_f 0 (А), 0 (Б), 0,05 (В), 0,27 (Г).

Cyclo(-Lys(Z)-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Leu-) (XVI). 1,54 г (1,1 ммоль) соединения (XV) растворяли в 1,6 л безводного диоксиана, добавляли 0,55 мл (3,3 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина и выдерживали 72 ч при 20° С. Упаривали, остаток растворяли в 300 мл СНСl₃, промывали 10% КНСО₄ (150 мл) и водой и использовали для хроматографической очистки (элюировали системой Б). Фракции элюата, содержащие предполагаемый частично очищенный циклопептид (XVI), объединяли, упаривали, остаток растворяли в 100 мл СНСl₃ и снова очищали (элюировали 5 л системы А, затем 3 л системы Б). Фракции элюата, содержащие чистый циклопептид, объединяли, упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход соединения (XVI) 0,57 г (45%). Т. пл. 185–205° С. $[\alpha]_D^{20}$ –61,2° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,50 (Б), 0,41 (В), 0,40 (Г). Мол. масса: найдено криоскопически [7] 913, вычислено 1129.

Cyclo(-Leu-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Leu-) · 2CH₃COOH · 3H₂O (ЦГК) синтезировали из соединения (XVI) аналогично получению ЦЛБ из соединения (XIII). Используя капельную противоточную хроматографию (рисунок), из 198 мг неочищенного продукта получили 125 мг чистого ЦГК. Выход ЦГК, считая на соединение (XVI), 63% $[\alpha]_D^{20}$ –79,4° (с 1, вода). R_f 0 (В), 0,27 (Г), 0,27 (Д). E_{HIS} 0,60. k' 3,08. Расщепление трипсином [16] дает только один продукт. Данные масс-спектрометрии с десорбцией полем, m/z : (M+H)⁺ 950, (M+H+Na)⁺ 973. Аминокислотный состав: Lys 1,24 (1), Arg 0,90 (1), Pro 3,33 (3), Gly 2,00 (2), Phe 1,04 (1).

Z-Lys(Boc)-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH (XVII) синтезировали из Z-Lys(Boc)-OPfp [14] и соединения (I) [6] аналогично получению соединения (II). Выход соединения (XVII) 96%. Т. пл. 65–70°. $[\alpha]_D^{20}$ –43,6° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,06 (Б), 0,09 (В), 0,45 (Г).

Z-Lys(Boc)-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH (XVII) синтезировали из соединения (XVII) аналогично получению соединения (VII) с выходом 95%.

Boc-Leu-Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH (XIX) синтезировали из Boc-Leu-OPfp [14] и соединения (XVIII) аналогично получению соединения (II) с выходом 89%. Т. пл. 121–125° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20}$ –46,1° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,07 (Б), 0,45 (Г).

Boc-Leu-Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OPfp (XX) синтезировали из соединения (XIX) аналогично получению соединения (VI) с количественным выходом. Т. пл. 120–127° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20}$ –38,2° (с 1, DMF). R_f 0,15 (А), 0,60 (Б), 0,79 (В), 0,80 (Г).

Boc-Leu-Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OH (XXII) синтезировали из соединения (XX) и H-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OH-CF₃COOH (XXI) [6] аналогично получению соединения (II). Неочищенный пептид растворяли в СНСl₃ и очищали на силикагеле (элюировали системой А). Фракции элюата, содержащие чистый пептид, объединяли, упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Вы-

ход соединения (XXII) 73%. Т. пл. 135–141° С. $[\alpha]_D^{20} -52,5^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,29 (Б), 0,36 (В), 0,67 (Г).

$\overline{\text{Boc-Leu-Z-Lys-Arg(NO}_2\text{)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OPfp}}$ (XXIII) синтезировали из соединения (XXII) аналогично получению соединения (VI) с количественным выходом. Т. пл. 131–136° С. $[\alpha]_D^{20} -40,4^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,10 (А), 0,60 (Б), 0,79 (В), 0,81 (Г).

$\overline{\text{H-Leu-Z-Lys-Arg(NO}_2\text{)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OPfp}\cdot\text{CF}_3\text{COOH}}$ (XXIV) синтезировали из соединения (XXIII) аналогично получению соединения (VII) с количественным выходом. Т. пл. 125–135° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20} -34,4^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0 (Б), 0,32 (В), 0,40 (Г).

$\overline{\text{Cyclo(Z-Lys-Arg(NO}_2\text{)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-Leu-)}}$ (XXV) синтезировали из соединения (XXIV) аналогично получению соединения (XVI). Неочищенный циклопептид растворяли в CHCl_3 и очищали на силикагеле (элюировали системой А, затем системой Б). Фракции элюата, содержащие частично очищенный циклопептид, объединяли, упаривали, остаток растворяли в смеси этанол – вода (4 : 3) и снова очищали на силикагеле (элюировали этой же смесью). Фракции элюата, содержащие чистый циклопептид, объединяли, упаривали, остаток выдерживали в вакууме при 1 мм рт. ст. в присутствии P_2O_5 . Выход соединения (XXV) 34%. Т. пл. 158–163° С. $[\alpha]_D^{20} -57,3^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,04 (А), 0,48 (Б), 0,59 (В), 0,56 (Г). Мол. масса: найдено криоскопически [7] 1215, вычислено 1227.

$\overline{\text{Cyclo(H-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro - Leu-)}} \cdot 2\text{CH}_3\text{COOH} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ЦЛК) синтезировали из соединения (XXV) аналогично получению ЦЛБ. Для капельной противоточной хроматографии использовали 150 трубочек (производительность 1,6 мл/ч, время разделения 14 сут). Из 260 мг неочищенного продукта получили 180 мг чистого циклопептида. Выход ЦЛК 62%. $[\alpha]_D^{20} -61,0^\circ$ (с 1, вода). R_f 0 (В), 0,27 (Г), 0,32 (Д). E_{HIS} 0,56. k' 2,17. Данные масс-спектрометрии с десорбцией полем, m/z : $(M+H)^+$ 980, $(M+H+Na)^+$ 1003. Аминокислотный состав: Lys 0,85 (1), Arg 0,85 (1), Pro 2,88 (3), Gly 1,00 (1), Phe 1,08 (1), Ser 1,02 (1), Leu 0,96 (1).

$\overline{\text{Z-Orn(Boc)-Arg(NO}_2\text{)-Pro-Pro-Gly-OH}}$ (XXVI) синтезировали из $\overline{\text{Z-Orn(Boc)-OPfp}}$ [14] и соединения (I) аналогично получению соединения (II) с выходом (XXVI) 98%. Т. пл. 70–80° С. $[\alpha]_D^{20} -42,1^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,06 (Б), 0,07 (В), 0,44 (Г).

$\overline{\text{Z-Orn-Arg(NO}_2\text{)-Pro-Pro-Gly-OH}\cdot\text{CF}_3\text{COOH}}$ (XXVII) синтезировали из соединения (XXVI) аналогично получению соединения (VII) с выходом 94%. Т. пл. 70–74° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20} -40,2^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0 (Б), 0 (В), 0,17 (Г). E_{HIS} 0,50.

$\overline{\text{Boc-Leu-Z-Orn-Arg(NO}_2\text{)-Pro-Pro-Gly-OH}}$ (XXVIII) синтезировали из $\overline{\text{Boc-Leu-OPfp}}$ [14] и соединения (XXVII) аналогично получению соединения (II) с выходом 89%. Т. пл. 137–140° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20} -46,8^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,06 (Б), 0,11 (В), 0,47 (Г).

$\overline{\text{Boc-Leu-Z-Orn-Arg(NO}_2\text{)-Pro-Pro-Gly-OPfp}}$ (XXIX) синтезировали из соединения (XXVIII) аналогично получению соединения (VI) с выходом 92%. $[\alpha]_D^{20} -41,5^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,16 (А), 0,62 (Б), 0,82 (В), 0,77 (Г).

$\overline{\text{Boc-Leu-Z-Orn-Arg(NO}_2\text{)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OH}}$ (XXX) синтезировали из соединения (XXIX) и $\overline{\text{H-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OH}\cdot\text{CF}_3\text{COOH}}$ (XXI) [6] аналогично получению соединения (II). Неочищенный пептид растворяли в CHCl_3 и очищали на силикагеле (элюировали системой А, затем системой Б). Фракции элюата, содержащие чистый пептид, объединяли, упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с без-

водным эфиром. Выход соединения (XXX) 47%. Т. пл. 170–178° (с разл.). $[\alpha]_D^{20}$ –44,4° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,40 (Б), 0,34 (В), 0,68 (Г).

Boc-Leu-Z-Orn-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OPfp (XXXI)

синтезировали из соединения (XXX) аналогично получению соединения (VI) с количественным выходом. $[\alpha]_D^{20}$ –31,9° (с 1, DMF). R_f 0,12 (А), 0,55 (Б), 0,82 (В), 0,75 (Г).

H-Leu-Z-Orn-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OPfp·CF₃COOH

(XXXII) синтезировали из соединения (XXXI) аналогично получению соединения (VII) с выходом 94%. Т. пл. 113–120° С. $[\alpha]_D^{20}$ –28,5° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0 (Б), 0,29 (В), 0,49 (Г).

Cyclo(Z-Orn-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-Leu-) (XXXIII)

синтезировали из соединения (XXXII) аналогично получению соединения (XVI). Неочищенный продукт растворяли в СНCl₃ и очищали на силикагеле – элюировали смесью *n*-бутанол – этилацетат – СН₃COOH – вода (4 : 2 : 0,2 : 0,3). Фракции элюата, содержащие частично очищенный циклопептид, объединяли, упаривали, остаток растворяли в смеси этанол – вода (4 : 3) и очищали на силасорбе С₁₈, элюировали этой же смесью. Фракции элюата, содержащие чистый циклопептид, объединяли, упаривали, остаток выдерживали в вакууме при 1 мм рт. ст. в присутствии Р₂О₅. Выход соединения (XXXIII) 45%. Т. пл. 167–172° С. $[\alpha]_D^{20}$ –55,6° (с 1, DMF). R_f 0,06 (А), 0,52 (Б), 0,70 (В), 0,65 (Г). Мол. масса: найдено криоскопически [7] 1174, вычислено 1284.

Cyclo(H-Orn-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe - Ser - Pro-Leu-)·2CH₃COOH·6H₂O

(ЦОК) синтезировали из соединения (XXXIII) аналогично получению ЦЛБ. Для капельной противоточной хроматографии использовали 150 трубочек. Из 180 мг неочищенного продукта получили 112 мг чистого ЦОК. Выход ЦОК 55%, считая на соединение (XXXIII). $[\alpha]_D^{20}$ –46,8° (с 1, вода). R_f 0 (В), 0,31 (Г), 0,33 (Д). E_{HIS} 0,57. k' 1,83. Расщепление химотрипсином [16] в течение 2 ч дает только один продукт. Данные масс-спектрометрии с десорбцией полем, m/z : (M+H)⁺966. Аминокислотный состав: Orn 0,86 (1), Arg 0,98 (1), Pro 3,27 (3), Gly 1,00 (1), Phe 1,02 (1), Ser 0,85 (1), Leu 0,88 (1). Окисление гидролизата в присутствии оксидазы *L*-аминокислот [9] показало отсутствие *D*-изомеров Arg, Phe, Leu и Ser.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hruby V. J. // Life Sci. 1982. V. 31. № 3. P. 189–200.
2. Саулигис Ю. Б., Лиениньш Э. Э., Секацис И. П., Шендерович М. Д., Мугулис Ф. К., Мугуле И. Э., Чипенс Г. И. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1013–1025.
3. Саулигис Ю. Б., Лиениньш Э. Э., Секацис И. П., Мугулис Ф. К., Мугуле И. Э., Чипенс Г. И. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 437–447.
4. Chipens G. I., Mutulis F. K., Myshlyakova N. V., Misina I. P., Vitolina R. O., Klusha V. J., Katayev V. S. // Int. J. Peptide and Protein. Res. 1985. V. 26. № 5. P. 460–468.
5. Рагкевич М. П. // Синтез и исследование биологически активных соединений. Тезисы докладов IX конференции молодых ученых./Ред. Пудова О. А., Геворгян В. Н., Гейман И. И. Рига, 1987. С. 57.
6. Мугуле И. Э., Мугулис Ф. К., Эрглис Д. П., Якстия Д. А., Секацис И. П., Розите С. Х., Григорьева В. Д., Мисина И. П., Чипенс Г. И. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 299–307.
7. Берлин А. Я. Техника лабораторной работы в органической химии. М.: Химия, 1972. С. 255–259.
8. Tanimura T., Pisano J. J., Ito Y., Bowman R. L. // Science. 1970. V. 169. № 3940. P. 54–56.
9. van Zon A., Beyerman H. C. // Helv. chim. acta. 1973. V. 56. № 5. P. 1729–1740.
10. Meister A., Levintow L. // J. Biol. Chem. 1951. V. 192. № 2. P. 535–541.
11. Devillier P., Renoux M., Giroud J. P., Regoli D. // Eur. J. Pharmacol. 1985. V. 117. № 1. P. 89–96.
12. May C., Syman M., Aberto R., Cheng J. // J. Allergy. 1970. V. 46. № 1. P. 12–20.
13. van Rossum J. M. // Arch. Int. Pharmacodyn. 1963. V. 143. № 3–4. P. 299–300.
14. Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I. // Ann. 1973. № 9. P. 1421–1429.

15. Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M. // J. Amer. Chem. Soc. 1967. V. 89. № 1. P. 183-184.
16. Дэвены Т., Гергей Я. АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ. М.: Мир, 1976. С. 168.
17. Broadbent W., Morley J. S., Stone B. E. // J. Chem. Soc. C, 1967. № 24. P. 2632-2636.

Поступила в редакцию
22.IV.1988
После доработки
14.IX.1988

CYCLIC ANALOGUES OF DES-Arg⁹[Leu⁸]BRADYKININ

MUTULE I. E., MUTULIS F. K., ROZITE S. H., PORUNKEVICH E. A., RATKEVICS M. P.,
MYSHLYAKOVA N. V., INDULENS J. I., KLUSA V. E., CHIPENS G. I.

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

Four cyclic derivatives of des-Arg⁹[Leu⁸]bradykinin have been obtained by classical methods of peptide chemistry. They are cyclo-(X-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Leu-), where X=Lys or none, and cyclo-(Y-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Leu-), where Y=Lys or Orn. Peptide bonds have been formed by the pentafluorophenylester method, and cyclization has been carried out in a diluted dioxane solution with 40% yield. Subsequent cleavage of protecting groups was made by treatment with hydrogen fluoride. The products obtained were purified by droplet counter-current chromatography. These substances liberate histamin from the rat mast cells comparably to bradykinin and fail to produce myotropic and vascular effects.