



УДК 577.175.853'17 : 547.964.4.057

© 1990 г.

*И. Э. Мутуле, Ф. К. Мутулис, Н. В. Мшилякова,
М. М. Веверис, Б. В. Голубева, Е. А. Порункевич,
М. П. Раткевич, Г. М. Стразда, В. Е. Клуша,
Ю. Бергманн*, И. П. Секацис, В. Д. Григорьева,
А. В. Сулима**, Г. И. Чиплис*

ЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ БРАДИКИНИНА, СОДЕРЖАЩИЕ КАРБОКСИЛЬНУЮ ГРУППУ

Институт органического синтеза Латвийской АН, Рига;

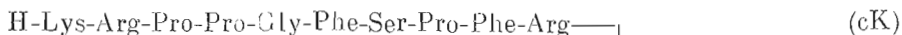
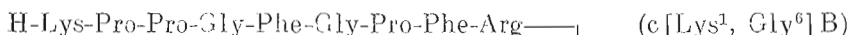
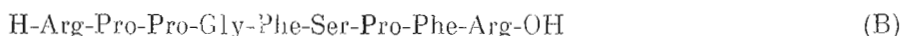
**Центральный институт молекулярной биологии АН ГДР, Берлин;*

*** Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина АН СССР,
Москва*

Синтезированы 1^{α} - β -карбокспропионил-cyclo(9 \rightarrow 1^ε)-[Lys¹, Gly⁶] брадикинин (Suc-c[Lys¹, Gly⁶]B), 1^{α} - β -карбокспропионил-cyclo(10 \rightarrow 1^ε)каллидин (Suc-cK), cyclo(10^γ \rightarrow 1^ε)-[Glu¹⁰]каллидин(c[Glu¹⁰]K) и cyclo(11^γ \rightarrow 1^ε)каллидилглутаминовая кислота (сKG). Suc-c[Lys¹, Gly⁶]B и Suc-cK получены ацилированием соответствующих циклопептидов янтарным ангидридом. c[Glu¹⁰]K и сKG получены классическими методами пептидной химии. c[Glu¹⁰]K и сKG обладают миотропной активностью в опытах на изолированной матке крысы ($\alpha = 0,73$ и $0,89$, $pD_2 = 6,61$ и $8,61$ соответственно). На электростимулируемых препаратах семьявыносящего протока крысы и подвздошной кишки морской свинки сKG обладает миотропным действием и на 100% потенцирует сокращения, вызываемые электрическим током. c[Glu¹⁰]K и сKG проявляют гистаминвысвобождающую активность на изолированных тучных клетках крыс ($EC_{50} = 4,91 \cdot 10^{-5}$ и $1,47 \cdot 10^{-6}$ М соответственно). Оба циклопептида вызывают понижение артериального давления при внутривенном введении у наркотизированных крыс, кошек и собак, а также увеличивают частоту сердечных сокращений животных. Активность сKG во всех тестах выше, чем активность c[Glu¹⁰]K. Suc-c[Lys¹, Gly⁶]B и Suc-cK не проявляют миотропную, гистаминвысвобождающую и гипотензивную активности, однако вызывают кратковременное увеличение кровотока в сонной артерии у кошек и собак.

В ходе проводимых нами исследований циклических аналогов брадикинина показано, что хотя некоторые из них по вторичной структуре и подобны природному биорегулятору, однако обладают высокой биологической активностью лишь в некоторых тестах. Например, cyclo(9 \rightarrow 1^ε)-[Lys¹, Gly⁶]брадикинин и cyclo(10 \rightarrow 1^ε)каллидин вызывают длительное понижение артериального давления у крыс [1] и намного превышают брадикинин по способности увеличивать проницаемость кровеносных сосудов крысы [2], но малоактивны в опытах на других животных [1].

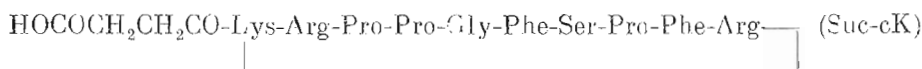
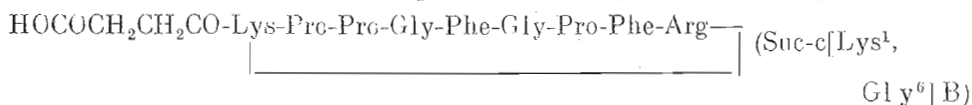
Причиной такой видовой специфичности циклических аналогов брадикинина может быть отсутствие в их молекуле карбоксильной группы, которая имеется в молекуле природного брадикинина:



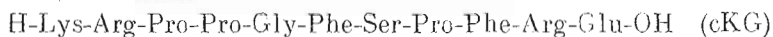
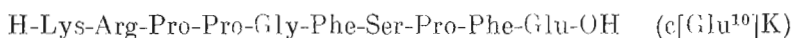
Принятые сокращения: Boc — трет-бутилоксикарбонил, Pfp — пентафторфенил, Z — бензилоксикарбонил, Suc — β -карбокспропионил-, DCHA — дидецклогексиламин.

Действительно, известно, что 9-декарбоксистрадикинин обладает лишь 0,25—0,5% активности природного соединения в опытах на матке крысы [3]. Это свидетельствует о существенном значении С-концевой карбоксильной группы в обеспечении биологических эффектов брадикинина. Поэтому представлялось целесообразным изучение циклических аналогов брадикинина, содержащих карбоксильную группу. Очевидно, что для имитации природного соединения она должна находиться недалеко от С-концевого остатка аргинина.

Простое решение поставленной задачи заключается в ацилировании α -аминогруппы остатка лизина янтарным ангидридом. Это привело к новым циклопептидам — 1 α - β -карбоксипропионил-cyclo(9 \rightarrow 1 ϵ)-[Lys¹, Gly⁶]-брадикинину и 1 α - β -карбоксипропионил-cyclo(10 \rightarrow 1 ϵ)каллидину:



Поскольку такая модификация блокирует N-концевую аминогруппу, которая имеет существенное значение для обеспечения биологического действия брадикинина, было решено синтезировать еще два новых циклических аналога брадикинина, лучше имитирующих молекулу природного соединения: cyclo(10 ν \rightarrow 1 ϵ)-[Glu¹⁰]каллидин и cyclo(11 ν \rightarrow 1 ϵ)каллидилглутаминовая кислота:

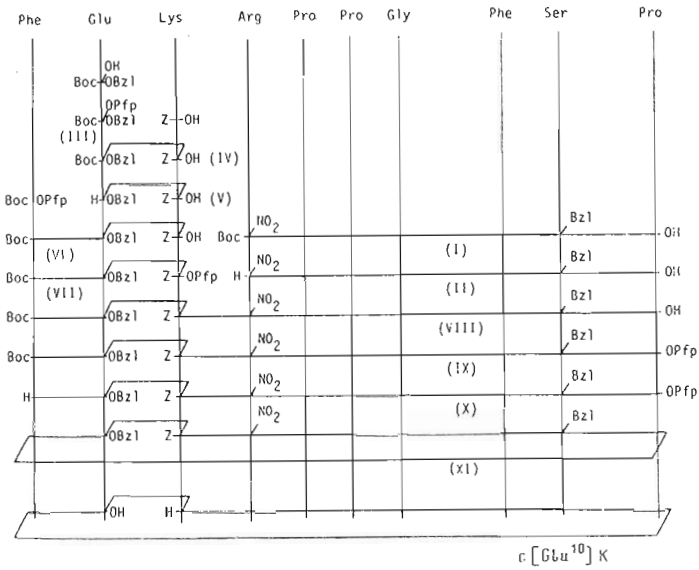


Как и в молекуле природного пептида, в этих соединениях на С-конце пептидного остова находится карбоксильная группа, а на N-конце сохранена α -аминогруппа остатка лизина. Циклическая структура образована соединением γ -карбонильной группы остатка глутаминовой кислоты и ϵ -аминогруппы остатка лизина. $\epsilon[\text{Glu}^{10}]\text{K}$ содержит полную аминокислотную последовательность брадикинина. cKG имитирует предполагаемую циклическую конформацию дез-Arg⁹-брадикинина, высокоспецифического агониста на рецепторах брадикинина типа B₁, содержащихся в аорте кролика [4].

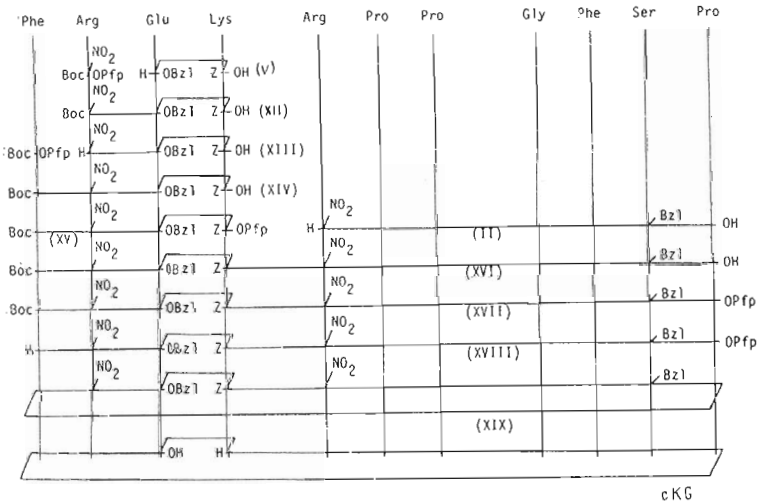
Соединения получены классическими методами пептидного синтеза в растворе (схемы 1, 2). α -Аминогруппы аминокислот блокировали Boc-группой, α -аминогруппу лизина — Z-группой. Гуанидиногруппа аргинина защищена нитрогруппой, С-концевые карбоксильные группы аминокислот и пептидов обычно не защищались. Конденсации фрагментов проводили, используя пентафторфениловые эфиры. В синтезах использовали полученный ранее [5] гептапептид (I).

Циклизацию линейных предшественников проводили, используя активированные пентафторфениловые эфиры. Полученные защищенные циклопептиды деблокировали каталитическим гидрогенолизом. Промежуточные и конечные продукты очищали хроматографически. Полученные целевые продукты однородны по ВЭЖХ, тонкослойной хроматографии и электрофорезу. Их строение подтверждено спектроскопией ЯМР, аминокислотным анализом и масс-спектрометрией.

Синтезированные аналоги использованы для биологических испытаний. В опытах *in vitro* изучена миотропная активность циклопептидов на матке крысы и их гистаминвысвобождающая активность на изолированных тучных клетках крыс. Миотропная активность $\epsilon[\text{Glu}^{10}]\text{K}$ и cKG испытана также в опытах на электростимулируемых препаратах семявыносящего протока крысы и продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки. В опытах *in vivo* исследовано влияние циклопептидов на артериальное



Синтез сусло(10^γ → 1^ε)-[Glu¹⁰]каллидина



Синтез сусло(11^γ → 1^ε)каллидил-L-глутаминовой кислоты

давление наркотизированных крыс, кошек и собак. В качестве стандартного вещества использовали брадикинин.

Установлено, что Suc-c[Lys¹, Gly⁶]В и Suc-сК не обладают миотропной, гипотензивной и гистаминвысвобождающей активностями.

Миотропная активность с[Glu¹⁰]К и сКГ на изолированной матке крысы характеризуется параметрами $\alpha = 0,73 \pm 0,1$ и $0,89 \pm 0,1$; $pD_2 = 6,61 \pm 0,26$ и $8,61 \pm 0,2$ соответственно* (активность брадикинина в тех же условиях составила $\alpha = 1,0$; $pD_2 = 9,94 \pm 0,15$ (рис. 1). Показано, что с[Glu¹⁰]К влияет на миотропный эффект брадикинина — присутствие низких концентраций (10^{-10} — 10^{-8} М) этого соединения вызывает независимое от дозы понижение значения pD_2 брадикинина в среднем на порядок, что, по-видимому, является следствием процессов тахифи-

* α — внутренняя активность, характеризует способность вещества вызывать эффект, pD_2 — показатель специфического средства, характеризует способность вещества связываться с рецептором (см. «Экспер. часть»).

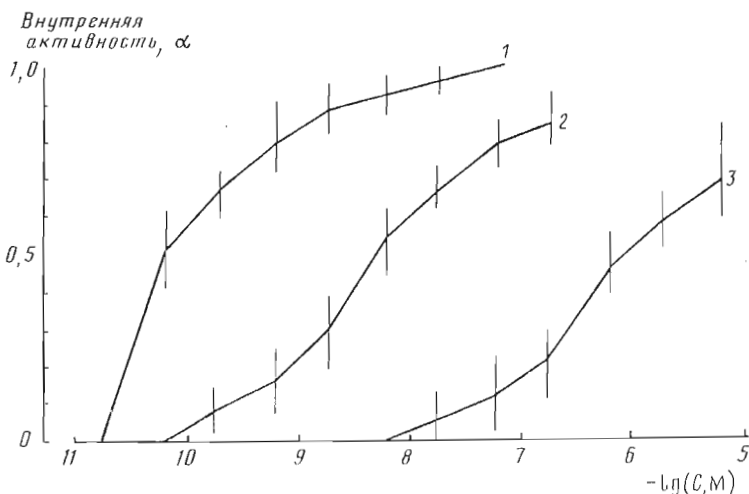


Рис. 1. Кумулятивные кривые «доза — эффект» брадикинина (1), сКГ (2) и с[Glu¹⁰]К (3), полученные в экспериментах на матке крысы

лаксии. Оба соединения в диапазоне концентраций 10^{-10} — 10^{-6} М не влияли на сократительную активность семявыносящего протока и продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки. В концентрации 10^{-5} М сКГ подобно брадикинину в концентрации 10^{-7} М обладает кратковременным миотропным действием на оба гладкомышечных препарата и потенцирует на 100% (~ 10 мин) сокращения, вызываемые электрическим током. с[Glu¹⁰]К в концентрации 10^{-5} М не обладает миотропным эффектом, но на 20% потенцирует сокращения, вызываемые электрическим током.

Гистаминвысвобождающую активность с[Glu¹⁰]К и сКГ исследовали на перитонеальных тучных клетках крыс в диапазоне концентраций 10^{-8} — 10^{-4} М. Оба соединения обладали гистаминвысвобождающей активностью: с[Glu¹⁰]К — $EC_{30} = 4,91 \cdot 10^{-5}$ М; сКГ — $EC_{30} = 1,47 \cdot 10^{-6}$ М, $EC_{50} = 1,01 \cdot 10^{-6}$ М* (рис. 2). с[Glu¹⁰]К в концентрациях 10^{-12} — 10^{-6} М не обладал ингибирующим действием на гистаминвысвобождающий эффект брадикинина в концентрации 10^{-5} М.

Эксперименты *in vivo* привели к следующим результатам. В опытах на наркотизированных крысах установлено, что внутривенное введение обоих аналогов вызывает понижение артериального давления животного. с[Glu¹⁰]К в дозе 0,3 мг/кг понижает артериальное давление в среднем на 8% от исходного в течение 15—30 с, в дозе 0,6 мг/кг — на 17% от исходного в течение 30—60 с; в дозе 0,07 мг/кг — на 56% в течение 3—8 мин. В дозе 0,7 мг/кг сКГ в течение 1-й мин понижает артериальное давление в среднем на 60% от исходного давления, в течение 2-й мин давление восстанавливается на 30%, затем еще в течение более 2 ч продолжается восстановление его исходного уровня.

Показано также, что при предварительном введении интал (10 мг/кг) полностью снимает гипотензивный эффект сКГ в дозе 0,07 мг/кг и значительно укорачивает пролонгированную фазу его гипотензивного эффекта в дозе 0,7 мг/кг, не изменяя первую фазу эффекта (рис. 3).

Внутривенное введение аналогов наркотизированным кошкам в дозах 0,025—0,5 мг/кг вызывало трехфазное изменение артериального давления. Во время первой фазы артериальное давление кратковременно (в течение 30—60 с) понижалось на 10—35% от исходного давления, во время второй фазы повышалось (в основном систолическое) в течение 4—7 мин (на 5% превышало исходное давление). Затем в 67% случаев для сКГ и в 43% случаев для с[Glu¹⁰]К наблюдалось новое понижение артериального давления на 15% от исходного в течение 15 мин. Бради-

* EC_{30} , EC_{50} — концентрация пептида, при которой высвобождается 30 или 50% гистамина, содержащегося в тучных клетках образца.

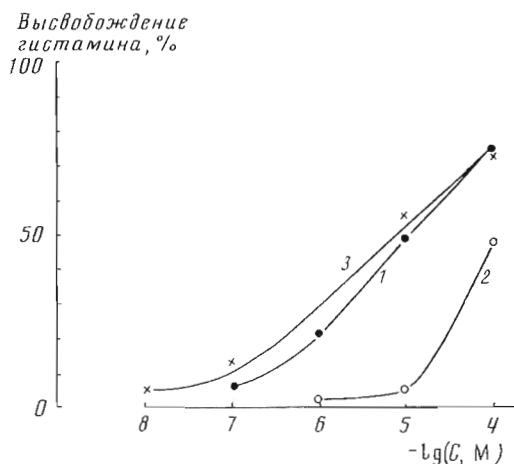


Рис. 2. Высвобождение гистамина из перитонеальных тучных клеток крысы под действием браникинина (1), с[Glu¹⁰]К (2) и сКГ (3)

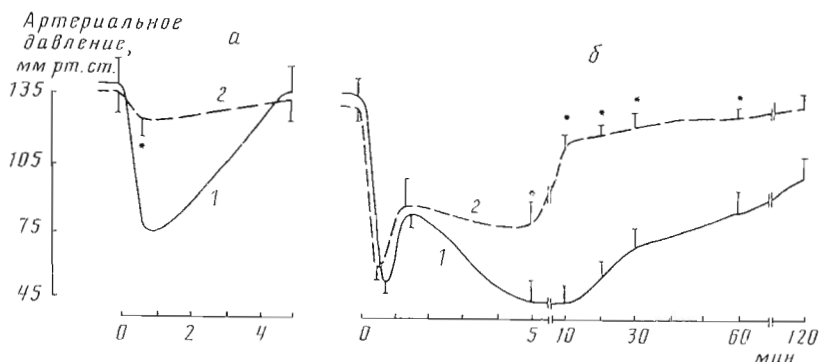


Рис. 3. Гипотензивный эффект сКГ (а — 0,07, б — 0,7 мг/кг) на крысах в отсутствие (1) и в присутствии (2) интала (10 мг/кг). $P < 0,05$

кинин в дозах 0,025—0,5 мг/кг вызывал однофазное понижение артериального давления (преимущественно диастолического) в течение 5 мин. с[Glu¹⁰]К в дозах 0,025 и 0,2 мг/кг существенно не влиял на частоту сердечных сокращений; в дозе 0,5 мг/кг в течение первых 5 мин этот показатель увеличивался на 5—8%. сКГ в дозе 0,025 мг/кг в течение 2—5 мин увеличивает частоту сердечных сокращений на 5—15%, затем в течение 15 мин понижает ее на 5—10%. Браникинин в дозах 0,025, 0,2 и 0,5 мг/кг частоту сердечных сокращений не изменял или понижал ее на 5—15% в течение 7 мин. с[Glu¹⁰]К и сКГ также вызывают увеличение кровотока в сонной и бедренной артериях наркотизированных кошек. с[Glu¹⁰]К вызывает зависимый от дозы, но слабо выраженный и кратковременный (3 мин) эффект. Браникинин более активно по сравнению с обоими соединениями увеличивает кровоток в малых дозах (0,025 и 0,2 мг/кг), а в дозе 0,5 мг/кг подобно сКГ повышает кровоток в сонной артерии на 50% в течение 7 мин.

Suc-c[Lys³, Gly⁶]В и Suc-cК в дозах до 0,5 мг/кг не изменяют артериальное давление наркотизированных крыс. Эти пептиды также существенно не влияют на системное артериальное давление, частоту сердечных сокращений и электрокардиограмму наркотизированных кошек, однако Suc-cК в дозе 0,2 мг/кг в течение 7 мин увеличивал скорость кровотока в сонной артерии на 14%. В опытах на наркотизированных собаках отмечено отсутствие эффекта обоих аналогов на артериальное давление, частоту сердечных сокращений и электрокардиограмму, но оба пептида вызывали увеличение скорости кровотока в сонной артерии на 5—15% в течение 3—10 мин.

Таким образом, установлено, что циклопептиды $c[\text{Glu}^{10}]\text{K}$ и $c\text{KG}$, содержащие карбоксильную группу, обладают широким спектром биологического действия, характерным для природного соединения. Это отличает их от всех ранее полученных циклических аналогов брадикинина, проявляющих видовую и тканевую специфичность. $c[\text{Lys}^1, \text{Gly}^6]\text{B}$, например, в отличие от $c[\text{Glu}^{10}]\text{K}$ и $c\text{KG}$ не вызывает понижение артериального давления у собак и кошек [1].

Предполагаем, что ингибирующее влияние стабилизатора мембран тучных клеток — интала на гипотензивный эффект $c\text{KG}$ свидетельствует о частичном опосредовании этого эффекта высвобождением гистамина. В пользу этого предположения говорит также обнаруженная нами гистаминвысвобождающая активность $c\text{KG}$. Аналогичная ситуация описана в случае нейротензина — показано, что определенную роль в проявлении его гипотензивного действия играет гистамин, секретлируемый клетками-депо [6].

Активность $c\text{KG}$ во всех опытах значительно выше, чем активность $c[\text{Glu}^{10}]\text{K}$. Это можно рассматривать как результат отсутствия в молекуле $c[\text{Glu}^{10}]\text{K}$ остатка аргинина, содержащего гуанидиновую группу. Последняя имеет существенное значение для обеспечения биологической активности брадикинина. Хорошо известно, что не только изъятие этой функции, но даже изменение числа метиленовых групп, отделяющее ее от пептидного остова, приводит к существенному ослаблению биологического действия [7].

Почти полное отсутствие биологической активности $\text{Suc-}c[\text{Lys}^1, \text{Gly}^6]\text{B}$ и $\text{Suc-}c\text{K}$ можно рассматривать как результат блокирования N-концевой аминокислотной группы или изменения суммарного заряда молекулы. Причиной отсутствия эффекта может быть также несоответствие места нахождения карбоксильной группы в этих молекулах таковому в молекуле брадикинина. Однако заслуживает внимания обнаруженное при воздействии этих пептидов кратковременное увеличение кровотока в сонной артерии животных.

Экспериментальная часть

Для синтеза использовали производные аминокислот, поставляемые фирмой Reanal (Венгрия) и НПО «Биохимреактив» (СССР). 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, время 1 ч) на бумаге FN-16 (ГДР) в 1 М уксусной кислоте, приведена подвижность относительно аргинина (E_{Arg}). На хроматограммах вещества обнаруживались в УФ-свете, а также с помощью нингидрина, реагентов Сакагучи или хлор-бензидина.

Строение соединений подтверждалось ПМР-спектроскопией на приборе Bruker WH-90 (ФРГ); химические сдвиги, форма и интенсивность сигналов соответствовали предполагаемому строению пептидов. Масс-спектры получены на приборе MS-50 (Великобритания). Аминокислотный анализ выполняли на анализаторе Bioscal BC-200 (ФРГ) после 24-часового гидролиза пептидов 5,7 н. HCl в запаянной ампуле при 110° С. Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на приборе Du Pont 830 (США), приведены коэффициенты емкости k' , а также носитель и состав подвижной фазы. Хроматографическую очистку проводили на приборе Jobin Yvon Chromatospac Prep 10 (Франция), размер колонки 4 × 35 см, использовали силикагель Н 60 (Merck, ФРГ). Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer 141 (Швеция).

$\text{HOCOC}_2\text{H}_2\text{CO-Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg}^1$ (*Suc-c[Lys¹, Gly⁶]B*). К раствору 265 мг (0,24 ммоль) cyclo(9 → 1^ε)-Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg·2CH₃COOH [8] и 27 мг (0,24 ммоль) гидрохлорида пиридина в 20 мл DMF добавляли 48 мг (0,48 ммоль) ангидрида янтарной кислоты и 0,12 мл (0,72 ммоль) диизопропилэтиламина. Выдерживали 24 ч при 20° С, упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром, растворяли в 5 мл воды и очищали хроматографически на колонке (1,6 × 40 см) с СМ-целлюлозой (Whatman) в NH₄⁺-форме. Элюировали раствором ацетата аммония в линейном градиенте концентраций (0,01 → 0,1 М). Фракции элюата, по данным ВЭЖХ, содержащие чистый предполагаемый Suc-c[Lys¹, Gly⁶]B объединяли и лиофилизировали. Полученный продукт растворяли в 20 мл воды, фильтровали, фильтрат снова лиофилизировали. Выход Suc-c[Lys¹, Gly⁶]B 249 мг (84%). Т. пл. 219—224° С. $[\alpha]_D^{20}$ —76,6° (с 1, вода). R_f O (B), 0,22 (Г), 0,34 (Д). k' 1,9 (Silasorb C₁₈, CH₃CN — 0,2 М CH₃COONH₄, 1 : 3); 3,36 (Separon CN, CH₃CN — 0,2 М CH₃COONH₄, 1 : 3). E_{Arg} 0,48. Аминокислотный состав: Lys 0,90 (1), Pro 3,36 (3), Gly 2,00 (2), Phe 1,87 (2), Arg 0,86 (1).

$\text{HOCOC}_2\text{H}_2\text{CO-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg}^1\cdot\text{CH}_3\text{COOH}$ (*Suc-cK*) синтезировали из cyclo(10 → 1^ε)-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg·3CH₃COOH [8] как описано в предыдущем эксперименте. В реакцию вводили 208 мг (0,15 ммоль) сК, 35 мг (0,30 ммоль) гидрохлорида пиридина, 15 мг (0,15 ммоль) ангидрида янтарной кислоты и 0,4 мл (0,60 ммоль) диизопропилэтиламина. Выход 146 мг (73%). Т. пл. 205—210° С. $[\alpha]_D^{20}$ —70,5° (с 1, вода). R_f O(B), 0,22 (Г), 0,27 (Д). k' 5,8 (Silasorb C₁₈, CH₃CN — 0,2 М CH₃COONH₄, 1 : 3). E_{Arg} 0,72. Аминокислотный состав: Lys 0,86 (1), Arg 1,90 (2), Pro 2,00 (2), Gly 1,00 (1), Phe 1,92 (2), Ser 0,92 (1).

H-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OH·HCl (II). К раствору 2,7 г (2,7 ммоль) Boc-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OH (I) [5] в 100 мл уксусной кислоты добавляли 1,73 мл (13,6 ммоль) 7,84 М раствора HCl в диоксане и перемешивали 2,5 ч при 20° С. Упаривали при 20° С, остаток закристаллизовали растиранием с безводным эфиром. Фильтровали, осадок выдерживали при 1 мм рт. ст. в присутствии KOH. Выход 2,38 г (94,2%). Т. пл. 177—180° С. $[\alpha]_D^{20}$ —57,5° (с 1, DMF). R_f 0,02 (A), 0,06 (B), 0,16 (Г), 0,29 (Д), 0,46 (E).

Boc-Glu(OPfp)-OBzl (III). 7,5 г (14,4 ммоль) Boc-Glu-OBzl·DCHA встряхивали со смесью 100 мл этилацетата и 50 мл 10% KHSO₄ до растворения. Органический слой промывали 50 мл 10% KHSO₄ и 50 мл воды, сушили MgSO₄. Добавляли раствор 3,18 г (17,3 ммоль) пентафторфенола в 50 мл безводного этилацетата и охлаждали до 0° С. Затем добавляли охлажденный раствор 3,56 г (17,3 ммоль) дициклогексилкарбодимиды в 50 мл безводного этилацетата и выдерживали 18 ч при 20° С. Фильтровали, фильтрат упаривали. Остаток закристаллизовали растиранием с гексаном. Выход 5,72 г (78%).

Boc-Glu-OBzl Z-Lys-OH·DCHA (IV). К суспензии 2,72 г (6,92 ммоль) Z-Lys-OH [9] в 50 мл DMF добавляли 3,48 г (6,92 ммоль) соединения (III) и 3,5 мл (20,7 ммоль) диизопропилэтиламина и перемешивали 48 ч при 20° С. Упаривали, остаток растворяли в 200 мл хлороформа и использовали для хроматографической очистки. Элюировали хлороформом (2 л), затем системой А (2 л). Фракции элюата, содержащие, по данным ТСХ, чистый дипептид, объединяли, упаривали, остаток растворяли в безводном этилацетате (200 мл) и добавляли 1,2 мл (6,9 ммоль) дициклогексилкарбодимиды и выдерживали 24 ч при 0° С. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали безводным эфиром. Выход 3,43 г (63,6%). Т. пл. 140—142° С. $[\alpha]_D^{20}$ —5,5° (с 1, DMF). R_f 0,75 (A), 0,85 (B), 0,96 (B).

H-Glu-OBzl Z-Lys-OH·HCl (V). 2,73 г (3,5 ммоль) соединения (IV) встряхивали со смесью 100 мл этилацетата и 50 мл 10% KHSO₄ до рас-

творения. Органический слой отделили, промывали 50 мл воды и сушили $MgSO_4$. Фильтровали, к фильтрату добавляли 5 мл (10,5 ммоль) 3,5 М раствора HCl в этилацетате. Перемешивали 2,5 ч при $20^\circ C$, упаривали при этой же температуре. Остаток закристаллизовали растиранием с безводным эфиром. Фильтровали, осадок выдерживали при 1 мм рт. ст. в присутствии KOH . Выход 1,56 г (83%). Т. пл. $67-72^\circ C$ (с разл.). $[\alpha]_D^{20} 0^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,14 (А), 0,29 (Б), 0,41 (В), 0,63 (Г), 0,35 (Д), 0,54 (Е).

Woc-Phe-Glu-OBzl Z-Lys-OH (VI). К суспензии 1,2 г (2,23 ммоль) соединения (V) в 100 мл безводного CH_2Cl_2 добавляли 1,0 г (2,33 ммоль) *Woc-Phe-OPfp* [10] и 1,2 мл (7,0 ммоль) диизопропилэтиламина. Перемешивали 6 ч при $20^\circ C$. Полученный раствор промывали 10% $KHSO_4$ (2×50 мл), затем 50 мл воды, сушили $MgSO_4$. Фильтровали, фильтрат упаривали, остаток закристаллизовали растиранием с гексаном. Выход 1,32 г (76%). Т. пл. $79-81^\circ C$. $[\alpha]_D^{20} -8,0^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,78 (А), 0,95 (Б), 0,95 (В), 0,92 (Г).

Woc-Phe-Glu-OBzl Z-Lys-OPfp (VII). К раствору 1,32 г (1,76 ммоль) соединения (VI) в 150 мл безводного CH_2Cl_2 добавляли комплекс дициклогексилкарбодимид с пентафторфенолом (1 : 3) [11] и выдерживали 16 ч при $20^\circ C$. Фильтровали, фильтрат упаривали, остаток закристаллизовали растиранием с гексаном. Выдерживали при 1 мм рт. ст. в присутствии KOH . Выход 1,6 г (99%). Т. пл. $135-137^\circ C$ (с разл.). $[\alpha]_D^{20} -9,0^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,89 (А), 0,95 (Б), 0,95 (В), 0,90 (Г).

Woc-Phe-Glu-OBzl Z-Lys-Arg(NO_2)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OH (VIII) синтезировали из соединений (VII) и (II) аналогично получению соединения (VI). Выдерживали 20 ч, закристаллизовали растиранием с безводным эфиром. Выход 1,92 г (92%). Т. пл. $131-135^\circ C$. $[\alpha]_D^{20} -35,4^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,36 (А), 0,63 (Б), 0,86 (В), 0,61 (Г).

Woc-Phe-Glu-OBzl Z-Lys-Arg(NO_2)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OPfp (IX) синтезировали из соединения (VIII) аналогично получению соединения (VII). Закристаллизовали растиранием с эфиром. Выход 2,1 г (99%). Т. пл. $118-125^\circ C$. $[\alpha]_D^{20} -35,1^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,53 (А), 0,75 (Б), 0,90 (В), 0,74 (Г).

H-Phe-Glu-OBzl Z-Lys-Arg(NO_2)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OPfp \cdot CF_3COOH (X). 2,06 г (1,15 ммоль) соединения (IX) растворяли в смеси 4 мл CF_3COOH и 16 мл CH_2Cl_2 и выдерживали 1,5 ч при $0^\circ C$. Затем упаривали при $20^\circ C$, остаток закристаллизовали растиранием с безводным эфиром, выдерживали при 1 мм рт. ст. в присутствии KOH . Выход 1,73 г (83%). Т. пл. $125-129^\circ C$. $[\alpha]_D^{20} -39,2^\circ$. R_f 0,01 (А), 0,12 (Б), 0,39 (В), 0,24 (Г), 0,46 (Д).

Z-Lys-Arg(NO_2)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-Phe-Glu-OBzl (XI). К раствору 1,73 г (0,96 ммоль) соединения (X) в 1,2 л свежеперегнанного над Na диоксида добавляли 0,49 мл (2,88 ммоль) диизопропилэтиламина и выдерживали 24 ч при $20^\circ C$. Упаривали, остаток растворяли в 100 мл хлороформа, промывали 10% $KHSO_4$ (2×50 мл), затем водой (50 мл), сушили $MgSO_4$, фильтровали. Фильтрат использовали для хроматографической очистки. Элюировали смесь системы А с изопропанолом сначала в соотношении 10 : 1 (2,5 л), затем 5 : 1 (1 л). Фракции, содержащие, по данным ТСХ, чистый предполагаемый циклопептид, объединяли, упаривали, остаток закристаллизовали растиранием с безводным эфиром. Выход 0,89 г (61%). Т. пл. $134-140^\circ C$. $[\alpha]_D^{20} -41,5^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,36 (А), 0,50 (Б), 0,67 (В), 0,42 (Г). k' 1,70 (Zorbax C_8 , $CH_3CN - CF_3COOH - вода$, 60 : 0,1 : 40).

H-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Glu-OH \cdot 2HCl(cGlu^{10})K. К раствору 102 мг (68 ммоль) соединения (XI) в смеси 30 мл метанола и

5 мл воды добавляли 0,053 мл (136 мкмоль) 2,54 М раствора HCl в диоксане и 0,3 г Pd-черни. Перемешивали и продували электролитически генерированным водородом с производительностью один пузырек в 1 с. Через каждые 8 ч катализатор меняли на свежий. Общее время гидрирования 24 ч. Затем фильтровали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 20 мл воды и лиофилизировали. Выход циклопептида 68 мг (82%). $[\alpha]_D^{20}$ —65,0° (с 2, вода). R_f 0,1 (Г), 0,19 (Д). h' 3,36 (Zorbax C₈, CH₃CN — CF₃COOH — вода, 30 : 0,1 : 70); 1,88 (Zorbax C₈, CH₃CN — 0,2 М NH₄OCOCH₃, 3 : 7); 2,32 (Zorbax CN, CH₃CN — 0,2 М NH₄OCOCH₃). E_{Arg} 0,62 (1 М AcOH). Аминокислотный состав: Lys 1,04 (1), Arg 1,08 (1), Pro 3,43 (3), Gly 1,0 (1), Phe 2,29 (2), Ser 1,09 (1), Glu 1,15 (1). Данные масс-спектрометрии бомбардировки быстрыми атомами, m/z : (M + H)⁺ 1143.

Вос-Arg(NO₂)-Glu-OBzl Z-Lys-OH (XII). 1,33 г (3,3 ммоль) Вос-Arg(NO₂)₂-OPfp [10] и 1,5 г (2,9 ммоль) соединения (V) растворяли в 100 мл перегнанного DMF, охлаждали до 0° С и тремя одинаковыми порциями (через каждые 30 мин) добавляли 1,49 мл (8,7 ммоль) диизопротилэтиламина. Выдерживали 24 ч при 0° С и 24 ч при 20° С. Упаривали, остаток растворяли в 100 мл хлороформа, промывали 10% KHSO₄ (2 × 50 мл), затем 50 мл воды, сушили MgSO₄ и фильтровали. Фильтрат использовали для хроматографической очистки: элюировали хлороформом (2 л), затем смесью система А — хлороформ (1 : 4; 3 л). Фракции элюата, содержащие чистый предполагаемый трипептид, объединяли, упаривали, остаток закристаллизовали растиранием с безводным эфиром. Выход 1,03 г (44%). Т. пл. 83—89° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20}$ —9,7° (с 1, DMF). R_f 0,65 (А), 0,72 (Б), 0,79 (В), 0,93 (Г).

H-Arg(NO₂)₂-Glu-OBzl Z-Lys-OH·HCl (XIII). 1,68 г (2,1 ммоль) соединения (XII) растворяли в 10 мл безводного диоксана, добавляли 1,35 мл (10,5 ммоль), 7,84 М раствора HCl в диоксане. Выдерживали 2 ч при 0° С. Упаривали при 20° С, остаток закристаллизовали растиранием с безводным эфиром, выдерживали при 1 мм рт. ст. в присутствии KOH. Выход 1,54 г (99%). Т. разл. 103°С. $[\alpha]_D^{20}$ —1,5° (с 1, DMF). R_f 0,04 (А), 0,18 (Б), 0,31 (В), 0,40 (Г), 0,28 (Д), 0,46 (Е).

Вос-Phe-Arg(NO₂)-Glu-OBzl Z-Lys-OH (XIV). К раствору 0,97 г (2,25 ммоль) Вос-Phe-OPfp [10] и 1,66 г (2,25 ммоль) соединения (XIII) в 100 мл безводного CH₂Cl₂ добавляли 1,15 мл (6,75 ммоль) диизопротилэтиламина и выдерживали 18 ч при 20° С. Смесь промывали 10% KHSO₄ (2 × 50 мл), затем 50 мл воды, сушили MgSO₄, фильтровали, фильтрат упаривали. Остаток закристаллизовали растиранием с гексаном. Выход 1,69 г (78,6%). Т. пл. 74—76° С. $[\alpha]_D^{20}$ —13,0° (с 1 DMF). R_f 0,61 (А), 0,89 (Б), 0,94 (В), 0,87 (Г).

Вос-Phe-Arg(NO₂)-Glu-OBzl Z-Lys-OPfp (XV) синтезировали из соединения (XIV) аналогично получению соединения (VII) с выходом 98%. Т. пл. 105—109° С. $[\alpha]_D^{20}$ —14,4° (с 1, DMF). R_f 0,74 (А), 0,94 (Б), 0,99 (В), 0,94 (Г).

Вос-Phe-Arg(NO₂)-Glu-OBzl Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OH (XVI) синтезировали из соединения (XV) и соединения (II) аналогично получению соединения (XIV). Закристаллизовали растиранием с эфиром. Выход 96%. Т. пл. 149—155° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20}$ —33,1° (с 1, DMF). R_f 0,21 (А), 0,53 (Б), 0,75 (В), 0,67 (Г).

Вос-Phe-Arg(NO₂)-Glu-OBzl Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OPfp (XVII) синтезировали из соединения (XVI) аналогично получению соединения (VII). Выход 98%. Т. пл. >135° С (с разл.). $[\alpha]_D^{20}$ —31,2° (с 1, DMF). R_f 0,35 (А), 0,61 (Б), 0,89 (В), 0,75 (Г).

H-Phe-Arg(NO₂)-Glu-OBzl Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OPfp·CF₃COOH (XVIII) синтезировали из соединения (XVII) анало-

гично получению соединения (X) с выходом 99%. Т. пл. 127—132° С. $[\alpha]_D^{20} -33,6^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,02 (А), 0,05 (Б), 0,34 (В), 0,23 (Г), 0,25 (Д).

Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-Phe-Arg(NO₂)-Glu-OBzl (XIX) синтезировали из соединения (XVIII) аналогично получению соединения (XI). Элюировали последовательно системой А (2 л), смесью система А — изопропанол (6 : 1; 1 л) и системой Б (1,5 л). Фракции элюата, по данным ТСХ содержащие предполагаемый циклопептид (XIX), объединяли, упаривали, закристаллизовали растирением с безводным эфиром. Полученный продукт растворяли в хлороформе и снова очищали хроматографически. Элюировали смесью система В — этилацетат (1 : 1, 2 л). Фракции элюата, по данным ТСХ содержащие чистое предполагаемое соединение (XIX), объединяли, упаривали, закристаллизовали растирением с безводным эфиром. Выход 41,6%. Т. пл. 146—149° С. $[\alpha]_D^{20} -44,5^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,23 (А), 0,35 (Б), 0,59 (В), 0,37 (Г). k' 1,11 (Zorbax C₈, CH₃CN—CF₃COOH — вода, 60 : 0,1 : 40).

H-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Glu-OH·2HCl (сКГ) синтезировали из соединения (XIX) аналогично получению c[Glu¹⁰]К. Выход 86%. $[\alpha]_D^{20} -69,2^\circ$ (с 2, вода). R_f 0,04 (Г), 0,14 (Д). k' 2,33 (Zorbax C₈, CH₃CN — 0,2 М NH₄OCOCN₃, 3 : 7). E_{Arg} 0,75. Аминокислотный состав: Lys 1,12 (1), Arg 1,99 (2), Pro 3,04 (3), Gly 1,00 (1), Phe 2,20 (2), Ser 0,97 (1), Glu 1,08 (1). Данные масс-спектрометрии бомбардировки быстрыми атомами, m/z : (M + H)⁺ 1299.

Определение миотропной активности. Миотропную активность пептидов изучали на изолированной матке крыс-самок массой 200—220 г методом ван Россума [12]. Препараты инкубировали в растворе Жалона при 32° С, воздушной аэрации и нагрузке 1 г. Регистрацию сокращений производили в изометрическом режиме датчиком ТВ-611Г, соединенным с полиграфом RM-6000 (Nihon Kohden, Япония). Агонистические и антагонистические свойства соединений изучены в диапазоне концентраций 10⁻¹¹ — 10⁻⁵ М. Время предварительной экспозиции препаратов изучаемыми соединениями при исследовании их влияния на миотропный эффект брадикинина составляло 3 мин. По кумулятивным кривым концентрация — эффект вычисляли параметры, характеризующие взаимодействие пептида с рецепторами: «внутренняя» активность (α) и показатель специфического средства (pD₅₀) [12]. В опытах на электростимулируемых препаратах семявыносящего протока крысы и продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки [13] изолированные препараты инкубировали в растворе Кребса при 37° С, нагрузке 1 г и аэрации CO₂, время преинкубации составляло 30 мин. На препарат воздействовали импульсами электрического тока длительностью 0,1 мс, частотой 0,1 Гц и амплитудой 50—60 В. Время воздействия пептидов составляло 2 мин, последующая промывка — 5 мин. Диапазон концентраций — 10⁻¹⁰ — 10⁻⁵ М. Регистрацию изотонических сокращений осуществляли на четырехканальном самописце фирмы Beckman.

Изучение гистаминвысвобождающей активности проводили на изолированных тучных клетках крыс [14].

Воздействие веществ на артериальное давление наркотизированных нембуталом (40 мг/кг внутрибрюшинно) крыс обоего пола массой 200—250 г изучали при помощи преобразователя Bentley Trantec Physiological Pressure на двухканальном самописце Gemini (Ugo Bazile, Италия). Артериальное давление регистрировали из общей сонной артерии; пептиды вводили в бедренную вену в дозах 0,7—700 мкг на 1 кг массы животного в виде инъекций. Исследуемые вещества растворяли в физиологическом растворе из расчета 0,1 мл на 200 г массы животного.

При изучении механизма действия веществ на артериальное давление интал вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг за 3 мин до инъекции изучаемых соединений.

Влияние пептидов на артериальное давление и кровоток наркотизированных глюкохлоралозой (80 мг/кг) внутрибрюшинно и уретаном

(0,2 г/кг) внутрибрюшинно кошек обоего пола массой 2,8—3,6 кг изучали с помощью электроманометра RP-1500 (Narco Bio Systems, США) в левой бедренной артерии. Объемную скорость кровотока в правой сонной и левой бедренной артериях регистрировали электромагнитными флуометрами MFV-1200 (Nihon Kohden, Япония). Электрокардиограмму II стандартного отведения и запись других данных производили на физиографе DMP-4B (Narco Bio Systems, США). Изучаемые вещества растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривенно в дозах 0,025, 0,2 и 0,5 мг/кг.

Влияние пептидов на артериальное давление и кровоток собаки изучали с помощью аппаратуры, используемой для опытов с кошками. Животное бастард массой 12 кг наркотизировали этиминалом натрия (40 мг/кг внутрибрюшинно). Изучаемые вещества вводили через канюлю, ввязанную в левую бедренную вену, в дозах 0,02, 0,1 и 0,2 мг/кг с интервалами между введениями 20—35 мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chipens G. I., Mutulis F. K., Myshyakova N. V., Misina I. P., Vitolina R. O., Klusha V. J., Katayev B. S. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1985. V. 26. No 5. P. 460—468.
2. Whalley E. T. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1987. V. 336. No 1. P. 99—104.
3. Johnson W. H., Law H. D., Studer R. O. // J. Chem. Soc (C). 1971. P. 748—753.
4. Regoli D., Barabe J., Park W. K. // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1977. V. 55. No 4. P. 855—867.
5. Mutulis F. K., Chipens G. I., Mutule I. E., Maurops G. H. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1985. V. 26. No 5. P. 449—459.
6. Oishi M., Inagaki C., Takaori S. // Neuropeptides. 1984. V. 4. No 5. P. 351—359.
7. Paegelow I., Reissmann S., Arold H. // Pharmazie. 1979. V. 34. No 11. P. 697—713.
8. Мутуле И. Э., Мутулис Ф. К., Эрлис Д. П., Якстия Д. А., Секацис И. П., Розите С. Х., Григорьева В. Д., Мусиня И. П., Чипенс Г. И. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 299—307.
9. Scott J. W., Parker D., Parrish D. K. // Synth. Commun. 1981. V. 11. No 4. P. 303—314.
10. Kisfaludy L., Löw M., Nyèki O., Szirtes T., Schön I. // Ann. 1973. No 9. P. 1421—1429.
11. Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M. // J. Amer. Chem. Soc. 1967. V. 89. No 1. P. 183—184.
12. van Rossum J. M. // Arch. Int. Pharmacodyn. 1963. V. 145. No 3—4. P. 299—300.
13. Tousignant C., Dion S., Drapeau G., Regoli D. // Neuropeptides. 1987. V. 9. No 4. P. 333—343.
14. Раткевич М. П., Порункевич Е. А., Анцаис Ю. Е., Чипенс Г. И. // Биохимия. 1989. Т. 54. № 10. С. 1611—1616.

Поступила в редакцию
6.II.1990

I. MUTULE, F. MUTULIS, N. MYSHLIAKOVA, M. VEVERIS,
V. GOLUBEVA, E. PORUNKEVICH, M. RATKEVICH, G. STRAZDA,
V. KLUSA, J. BERGMANN*, I. SEKACIS, V. GRIGORYEVA,
A. SULIMA**, G. CHIPENS

CYCLIC ANALOGUES OF BRADYKININ CONTAINING A CARBOXYL GROUP

Institute of Organic Synthesis, Latvian Academy of Sciences, Riga:

** Zentralinstitut für Molekularbiologie, AdW der DDR, Berlin:*

*** M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

1 α - β -carboxypropionyl-cyclo(9 \rightarrow 1 $^{\epsilon}$)-[Lys 1 , Gly 6]bradykinin (Suc-c[Lys 1 , Gly 6]B), 1 α - β -carboxypropionyl-cyclo(10 \rightarrow 1 $^{\epsilon}$)kallidin (Suc-cK), cyclo(10 $^{\nu}$ \rightarrow 1 $^{\epsilon}$)-[Glu 10]kallidin (c[Glu 10]K) and cyclo(11 $^{\nu}$ \rightarrow 1 $^{\epsilon}$)kallidylglutamic acid (cKG) were synthesized. Suc-c[Lys 1 , Gly 6]B and Suc-cK were prepared by acylating the appropriate cyclopeptides with succinic anhydride. c[Glu 10]K and cKG were obtained by the classic peptide

synthesis, the cyclization being carried out with 61 and 42% yields, respectively. The protecting groups were then eliminated by catalytic hydrogenation. c[Glu¹⁰]K and cKG exerted myotropic action on isolated rat uterus (α 0.73 and 0.89, pD₂ 6.61 and 6.61, respectively). cKG displayed direct myotropic activity with respect to electrically stimulated rat vas deferens and guinea-pig ileum, potentiating the contractions (by 100%) in response to electric stimuli. c[Glu¹⁰]K and cKG elicit histamine release in isolated rat mast cells (EC₅₀ 4.91 · 10⁻⁵ and 1.47 · 10⁻⁶ M, respectively). Both cyclopeptides alter arterial pressure following intravenous administration to anaesthetized rats, cats and dogs and affect heart rate. In all assays cKG is more active than c[Glu¹⁰]K. Suc-c[Lys¹, Gly⁶]B and Suc-cK do not possess myotropic, histamine-releasing or hypotensive activity, though they were found to elicit a transient increase of bloodflow in cats and dogs.