



УДК 577.175.853'17:547.964.4.057

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПЕТЛЕОБРАЗНЫЕ АНАЛОГИ
БРАДИКИНИНА И ПОЛИСТЕСКИНИНА

*Мутуле И. Э., Мутулис Ф. К., Ландо О. Е.,
Ашманис А. А., Григорьева В. Д., Мыллякова Н. В.,
Клуша В. Е., Чипенс Г. И.*

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Классическими методами пептидной химии синтезированы «петлеобразные» производные брадикинина и полистескинина — Lys-Lys-Lys-[*cyclo*(9→1⁶), Lys¹, Gly⁶]-брадикинин и Lys-Lys-Lys-Leu-Arg-Gly-[*cyclo*(9→1⁶), Lys¹, Gly⁶]-брадикинин. В ходе синтеза «хвостовые» линейные фрагменты присоединялись к частично деблокированному циклопептиду. Защитные группы удалены обработкой фтористым водородом, целевые продукты очищены обращенно-фазовой и ионообменной хроматографией. В ходе биологических испытаний установлено, что в опытах *in vivo* на крысах оба соединения обладают характерной для циклических аналогов брадикинина пролонгированной гипотензивной активностью. В случае второго соединения понижение артериального давления предшествует кратковременный прессорный эффект. В экспериментах *in vitro* на матке крысы оба соединения проявили слабую мнотропную активность.

Согласно современным представлениям, природные биологически активные пептиды в растворе существуют в виде равновесной смеси конформеров. При комплексообразовании с рецептором конформационная подвижность пептидов резко ограничивается, образуется так называемая биологически активная конформация, которая может соответствовать одной из структур, существующих в растворе, но может и отличаться от них. Синтез соединений с фиксированной конформацией «активного центра» молекулы природного пептида, соответствующей его «биологически активной» форме, приводит к получению «супераналогов», обладающих крайне высокой биологической активностью, селективностью и пролонгированным действием. Эти свойства благоприятствуют применению пептидов в медицине.

Фиксация определенной пространственной структуры достигается образованием циклических пептидов, в которых ковалентной связью соединены либо концы, либо боковые цепи молекулы. Для создания такой структуры природную последовательность аминокислот часто приходится модифицировать введением функциональных групп, пригодных для создания дополнительной ковалентной связи.

Использование вышеописанного подхода позволило получить высокоактивные аналоги многих пептидных биорегуляторов [1–3]. Первые целенаправленные исследования по изучению конформационно ограниченных аналогов природных пептидов были проведены нами в отношении аналогов брадикинина и каллидина [4]. На основании результатов физико-химических исследований и данных полуэмпирических расчетов было показано, что брадикинин имеет квазициклическую структуру со сближенными N- и C-концами молекулы [5–7]. Предполагалось, что в водном растворе имеет место внутримолекулярное ионное взаимодействие [8], однако впоследствии было показано, что в данном случае «солевого мостика» не существует [9, 10]. Тем не менее формирование квазициклической структуры вполне вероятно при нахождении молекулы брадикинина в неполярной биофазе рецептора, после дегидратации заряженных групп [11]. Руководствуясь этой гипотезой, мы осуществили синтез ряда циклических

Принятые сокращения: DMF — диметилформамид, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, Pфг — пентафторфенил.

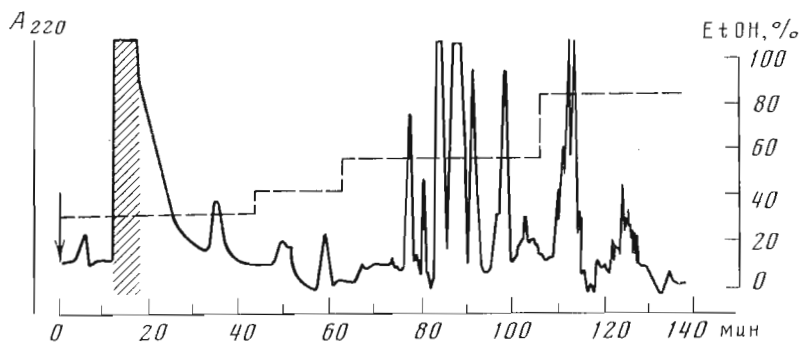


Рис. 1. Хроматография додекапептида (XV) на колонке Zorbax C₈ (2,12×25 см) в ступенчатом градиенте этанола в 0,2 н. ацетате аммония (содержание этанола 35, 45, 60 и 90%). Скорость элюции 15–16 мл/мин. Заштрихована отбираемая фракция

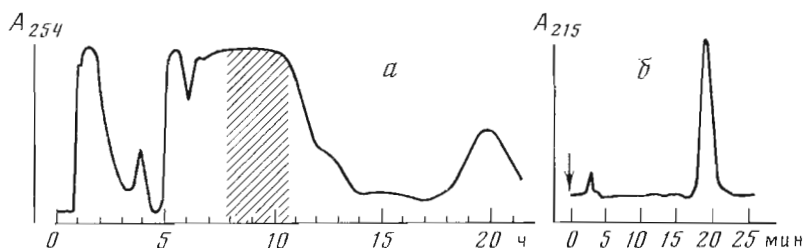


Рис. 2. *a* — Хроматография пентадекапептида (XIV) на силикагеле (две последовательно соединенные колонки 1×22 см, Lobar, size A, Merck) в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5, верхняя фаза). *б* — аналитическая хроматография выделенной фракции на колонке Zorbax C₁₈ (0,46×25 см) в системе ацетонитрил — 0,1 М КН₂РO₄+Н₃РO₄ (55:45), рН 2,5

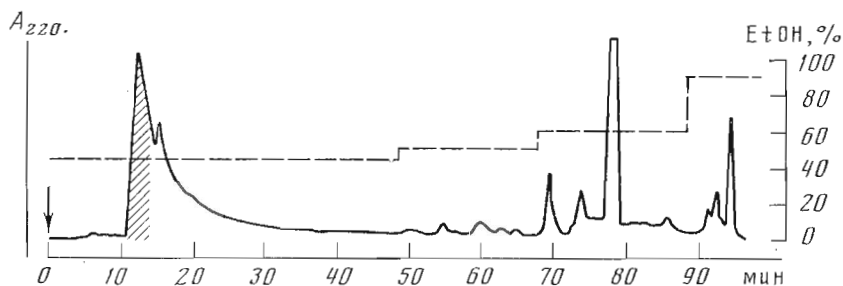


Рис. 3. Хроматография пентадекапептида (XVI) на колонке Zorbax C₈ (2,12×25 см) в ступенчатом градиенте этанола в 0,1 н. ацетате аммония (содержание этанола 45, 50, 60 и 90%). Скорость элюции 10–12 мл/мин. Заштрихована выделяемая фракция

давления становится пролонгированной. Соединение (XV) обладает гипотензивным воздействием без предварительной прессорной фазы, при увеличении дозы наблюдается пролонгация эффекта.

В опытах *in vitro* на матке крысы соединение (XVI) вызывает миотропный эффект (α 1,0; pD_2 $6,30 \pm 0,17$)*, равный по величине эффекту брадикинина, но в концентрациях, на 3 порядка превосходящих таковые у брадикинина. Соединение (XV) обладает еще меньшей миотропной активностью (α $0,38 \pm 0,03$) и кумулятивная кривая «концентрация — эффект» не параллельна кривой брадикинина (рис. 6).

Следовательно, впервые среди циклических аналогов брадикинина обнаружено соединение (XVI), которое обладает двойственным воздействием на кровяное давление — увеличением давления с последующим его

* α — внутренняя активность, характеризует способность вещества вызывать эффект, pD_2 — показатель специфического сродства, характеризует способность вещества взаимодействовать с рецептором.

Влияние «петлеобразных» аналогов брадикинина на артериальное давление наркотизированных крыс

Соединение	Доза, мкг/кг	Прессорный эффект		Депрессорный эффект	
		Величина, мм рт. ст.	Длительность, мин	Величина, мм рт. ст.	Длительность, мин
(XVI)	0,1	—	—	—	—
	1,0	9,5±1,3	1,5	—	—
	10	14,2±1,9	1,5-2	—	—
	102	25,4±2,6	2	7,5±1,8	2
	205	28,5±4,5	1	16,5±1,5	15 *
	307	20,5±3,5	0,5	23,0±1,0	15 *
(XV)	1000	20,2±3,2	0,5	27,0±0,8	60
	0,8	—	—	—	—
	83	—	—	—	—
	166	—	—	17,7±4,1	3
	250	—	—	25,0±5,7	4
	832	—	—	31,8±1,5	90

* Время, по истечении которого исходный уровень артериального давления восстанавливается на 90%.

понижением. Необходимо обратить внимание на высокую активность аналога (XVI) (прессорный эффект наблюдается уже в дозе 1,0 мкг на 1 кг веса животного). Возможно, что это соединение взаимодействует с двумя типами рецепторов, которые, отличаясь по сродству к данному циклопептиду, активируются при различных концентрациях эффектора. Можно полагать, что остатки основных аминокислот, расположенные в «хвостовой части» молекулы, при этом выполняют «якорные» функции [19]. При соединении остатков основных аминокислот, вопреки ожиданиям, не увеличило гипотензивной активности исходного циклопептида: примерно одинаковые гипотензивные эффекты возникают при введении наркотизированным крысам 50 мкг ($4,5 \cdot 10^{-8}$ М) соединения (XVIII), 1,0 мг ($5 \cdot 10^{-7}$ М) соединения (XVI) (если не принимать во внимание прессорную фазу) и 0,8 мг ($5 \cdot 10^{-7}$ М) соединения (XV) на 1 кг веса животного. По-видимому, этот факт объясняется тонкими различиями в механизмах гипотензивного действия брадикинина и его циклических аналогов.

Миотропная активность «петлеобразных» аналогов, как и у ранее изученных циклических аналогов брадикинина, характеризуется пониженным сродством к рецепторам экстравазальной гладкой мускулатуры, что свидетельствует о некоторой избирательности действия их на артериальное давление.

Сходство биологических эффектов петлеобразных и ранее изученных циклических аналогов брадикинина позволяет предположить сходство механизмов их действия.

Экспериментальная часть

Для синтеза использованы производные аминокислот, поставляемые фирмой Reanal (Венгрия). Упаривание проводили на вакуумном испарителе при 30° С. Температуры плавления, которые определяли в открытых капиллярах, приведены без исправления. Индивидуальность полученных соединений проверяли с помощью ТСХ на пластинках Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄. Приведены хроматографические подвижности на пластинках Silufol UV 254 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), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5, верхняя фаза (В). Электрофорез осуществляли на бумаге FN-16 (ГДР) в 1 н. уксусной кислоте (Г), приведена подвижность относительно гистидина. Вещества обнаруживали в УФ-свете, а также с помощью нингидрина, паров иода, реагента Сакагучи или хлорбензидина.

Строение соединений подтверждалось ПМР-спектроскопией. Спектры ПМР (растворы в DMSO-*d*₆) получали на приборе Bruker WH-90 (ФРГ),

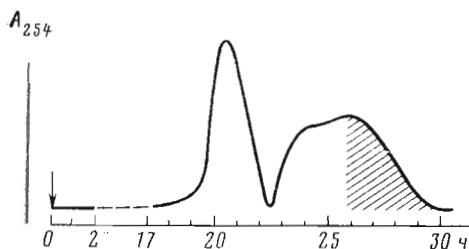


Рис. 4

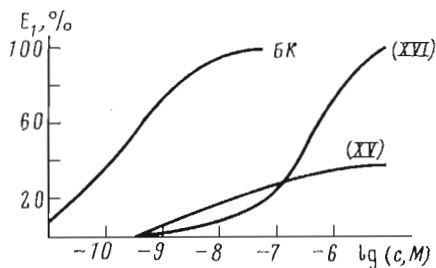


Рис. 6

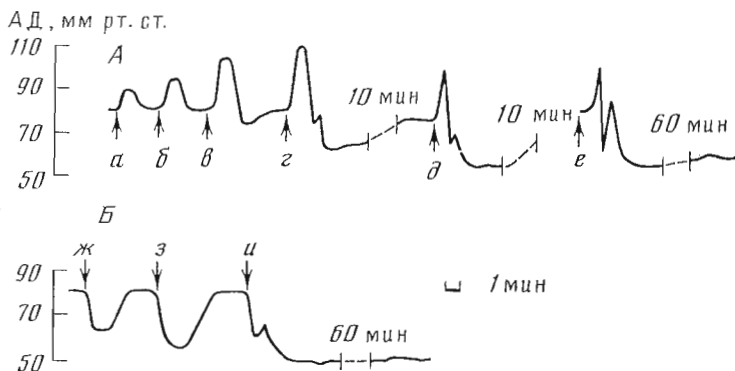


Рис. 5

Рис. 4. Хроматография пентадекапептида (XVI) на карбоксиметилцеллюлозе CM-32 в линейном градиенте ацетата аммония (0,01 н. $\text{NH}_4\text{OCOSCH}_3$, pH 4,5 \rightarrow 0,2 н. $\text{NH}_4\text{OCOSCH}_3$, pH 6,0). Заштрихована отбираемая область

Рис. 5. Влияние соединений (XVI) (А) и (XV) (Б) на артериальное давление (АД) наркотизированных крыс в дозах 1,0 (а), 10,0 (б), 102 (в), 203 (г), 307 (д), 1000 (е), 166 (ж), 250 (з) и 832 (и) мкг/кг

Рис. 6. Кумулятивные кривые «концентрация – эффект» брадикинина (БК) и соединений (XV) и (XVI), полученные в опытах на изолированной матке крысы

химические сдвиги, форма и интенсивность сигналов соответствовали строению пептидов. Аминокислотный анализ выполнен на анализаторе Bюсал BC-200 (ФРГ) после 24-часового гидролиза пептидов в запаянной ампуле при 110°C . Аналитическая и препаративная ВЭЖХ осуществлена на приборе Du Pont 830 (США), приведены коэффициент емкости k' , а также носитель и состав подвижной фазы.

Вос-Lys(Z)-ONb (I). Раствор 6,0 г (10,7 ммоль) дидицлогексиламмониевой соли Вос-Lys(Z)-ОН в 200 мл этилацетата встряхивали со 120 мл 10% водного раствора KHSO_4 . Органический слой отделяли, сушили безводным MgSO_4 , фильтровали, упаривали. Остаток растворяли в 120 мл DMF, добавляли 2,31 г (10,7 ммоль) *n*-нитробензилбромида и 1,50 мл (10,7 ммоль) триэтиламина. Смесь выдерживали 48 ч при 18°C , упаривали, остаток растворяли в 150 мл этилацетата. Добавляли 150 мл воды, органический слой отделяли и высушивали MgSO_4 . Раствор отфильтровывали, упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с гексаном. Выход 4,34 г (78,8%). Т. пл. $77-79^\circ\text{C}$ с разл. $[\alpha]_D^{20} -16,5^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,77 (А), 0,95 (Б), 0,98 (В).

H-Lys(Z)-ONb·CF₃COOH (II). 4,29 г (8,34 ммоль) соединения (I) растворяли в смеси 20 мл трифторуксусной кислоты и 80 мл хлористого метилена, выдерживали 30 мин при 20°C , затем упаривали при 0°C , остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Высушивали в вакуумном эксикаторе в присутствии КОН. Выход 4,28 г (97%). $[\alpha]_D^{20} +5,0^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,15 (А), 0,65 (Б), 0,74 (В).

Вос-Lys(Z)-Lys(Z)-ONb (III). Раствор Вос-Lys(Z)-ОН в этилацетате, полученный из 4,83 г (8,60 ммоль) дидицлогексиламмониевой соли (см.

получение соединения (I)), упаривали, остаток растворяли в 200 мл ацетонитрила, добавляли 1,17 мл (8,34 ммоль) триэтиламина, затем при 0° С — 2,11 г (8,34 ммоль) реагента Вудварда К. Перемешивали 1 ч при 0° С, затем добавляли 4,29 г (8,34 ммоль) соединения (II) и 1,17 мл (8,34 ммоль) триэтиламина. Выдерживали 20 ч при 20° С, затем упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата и добавляли 100 мл 10% водного раствора KHSO_4 . Органический слой отделяли, высушивали безводным MgSO_4 , фильтровали, упаривали до объема 30 мл и добавляли 200 мл гексана. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали 50 мл гексана. Выход 4,72 г (72,7%). Т. пл. 105–109° С. $[\alpha]_D^{20}$ –10,4° (с 1, DMF). R_f 0,70 (А), 0,93 (Б), 1,0 (В).

H-Lys(Z)-Lys(Z)-ONb-CF₃COOH (IV) получали из соединения (III) аналогично синтезу соединения (II), за исключением того, что продукт закристаллизовывали растиранием с гексаном. Выход 85,5%.

Z-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-ONb (V). К раствору 4,01 г (5,06 ммоль) соединения (IV) в 100 мл хлористого метилена добавляли 3,93 г (6,76 ммоль) *Z*-Lys(Z)-OPfp [21] и 1,73 мл (10,12 ммоль) дивизопрпилэтиламина. Выдерживали 1 ч при 20° С, затем добавляли 0,37 мл (3,4 ммоль) β-диметиламиноэтиламина. Выдерживали 30 мин, затем смесь экстрагировали 100 мл 10% водного раствора KHSO_4 . Органический слой отделяли, промывали 100 мл воды, затем высушивали MgSO_4 , фильтровали, фильтрат упаривали. Остаток закристаллизовывали растиранием с гексаном. Выход 5,0 г (92%). Т. пл. 139–141° С. $[\alpha]_D^{20}$ –11,0° (с 1, DMF). R_f 0,66 (А), 0,90 (Б), 1,00 (В). k' 5,4 (Zorbax C₁₈, ацетонитрил — вода — уксусная кислота, 60 : 39 : 1).

Z-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-N₂H₃ (VI). 1,50 г (1,4 ммоль) соединения (V) и 3,0 мл (62 ммоль) гидразингидрата кипятили 4 ч при перемешивании в 50 мл этанола. Затем выдерживали 20 ч при 0° С и фильтровали. Осадок на фильтре промывали эфиром, 1% водным KHSO_4 , затем водой. Сушили в эксикаторе в присутствии H_2SO_4 . Выход 0,90 г (67%). Т. пл. 198–201° С. $[\alpha]_D^{20}$ –10,5° (с 1, DMF). R_f 0,64 (А), 0,84 (Б), 1,00 (В).

Boc-Arg(NO₂)-Gly-OBu' (VII). 4,85 г (10 ммоль) Boc-Arg(NO₂)-OPfp, 2,13 г (10 ммоль) *H*-Gly-OBu'· H_3PO_3 и 2,78 мл (20 ммоль) триэтиламина растворяли в 200 мл DMF. Выдерживали 1 ч, затем упаривали. Остаток растворяли в смеси 100 мл 10% KHSO_4 и 100 мл хлороформа. Органический слой промывали 100 мл воды, затем высушивали MgSO_4 , фильтровали, фильтрат упаривали. Остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Полученный продукт очищали на колонке (3×100 см) с силикагелем Л 40-100 мкм (ЧССР), элюент — система А — изопропанол (4 : 1). Фракцию элюата, содержащую чистое соединение (VII), упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 1,64 г (38%).

H-Arg(NO₂)-Gly-OH·CF₃COOH (VIII). 0,95 г (2,2 ммоль) соединения (VII) растворяли в 6 мл трифторуксусной кислоты. Выдерживали 2 ч при 20° С, упаривали, остаток растирали с безводным эфиром. Выход 0,80 г (93%). Спектр ПМР (δ, м.д.): 1,29–2,0 (β, γ CH_2 , Arg); 2,96–3,44 (α CH , δ CH_2 , Arg); 3,84 (α CH_2 , Gly, д, J 5,4 Гц); 7,0–9,3 (NH, Arg); 8,78 (NH, Gly, т, J 5 Гц).

Boc-Leu-Arg(NO₂)-Gly-OH (IX). 0,80 г (2,0 ммоль) соединения (VIII), 0,81 г (2,0 ммоль) Boc-Leu-OPfp [21] и 1,03 мл (6,0 ммоль) дивизопрпилэтиламина перемешивали 48 ч в 100 мл хлористого метилена. Упаривали, остаток растворяли в смеси 100 мл 10% раствора KHSO_4 и 100 мл этилацетата. Через несколько минут в органическом слое образовался гелеобразный осадок. Фильтровали, осадок на фильтре промывали водой, сушили в эксикаторе, затем промывали эфиром. Выход 0,48 г (49%). Т. пл. >130° С с разл. $[\alpha]_D^{20}$ –19,5° (с 1, DMF). R_f 0,19 (А), 0,68 (Б), 0,88 (В). Спектр ПМР (δ, м.д.): 0,84 (δ CH_3 Leu, д, J 5,4 Гц); 1,36 ((CH_3)₃C, Boc, с); 1,0–2,0 (β CH_2 , γ CH , Leu; β, γ CH_2 , Arg); 2,9–3,4 (α CH , δ CH_2 , Arg); 3,75 (α CH_2 , Gly); 3,7–4,1 (α CH , Leu), 6,98 (NH, Boc, д, J 7,6 Гц); 7,5–9,3 (NH, Arg); 8,26 (NH, Gly).

H-Leu-Arg(NO₂)-Gly-OH-CF₃COOH (X). Получали из соединения (IX) аналогично синтезу соединения (VIII). Продолжительность реакции 1 ч. Выход 84%. Т. разл. >136° С. $[\alpha]_D^{20}$ -7,8° (с 1, DMF). *R_f* 0(A), 0,11(B), 0,68(B).

Z-Lys(Z)-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-Arg(NO₂)-Gly-OH (XI). К раствору 0,76 г (0,80 ммоль) соединения (VI) в 30 мл DMF добавляли 10 мл (3,3 ммоль) свежеприготовленного 0,33 М раствора HCl в тетрагидрофуране. Затем при -40° С по каплям добавляли охлажденный раствор 0,11 мл (0,80 ммоль) трет-бутилнитрита в 10 мл DMF. Перемешивали 50 мин при -10° С, охлаждали до -40° С, по каплям добавляли 0,56 мл (3,3 ммоль) диизопропилэтиламина, раствор 0,40 г (0,80 ммоль) соединения (X) и 0,27 мл (1,6 ммоль) диизопропилэтиламина в 25 мл DMF и выдерживали 48 ч при -5° С. Упаривали при 40° С, остаток перемешивали со 100 мл эфира, образовавшийся осадок отфильтровывали, перемешивали с 200 мл 1% KHSO₄, затем промывали водой и высушивали в эксикаторе при 1 мм рт. ст. в присутствии P₂O₅. Выход 0,80 г (76,3%). Т. пл. 182—187° С с разл. $[\alpha]_D^{20}$ -16,6° (с 1, DMF). *R_f* 0,21(A), 0,74(B), 1,00(B). *k'* 1,38 (Zorbax C₁₈, ацетонитрил — вода — уксусная кислота, 55 : 44 : 1). Спектр ПМР (δ, м.д.): 0,81 (δ CH₃, Leu); 1,0—1,9 (β, γ, δ CH₂, Lys, β CH₂, γ CH, Leu, β, γ CH₂, Arg); 2,6—3,1 (ε CH₂, Lys); 3,1—3,5 (α CH, δ CH₂, Arg); 3,73 (α CH₂, Gly); 4,0—4,4 (α CH, Lys); 4,98 (CH₂O, с); 7,0—8,7 (NH-протоны); 7,30 (C₆H₅).

cyclo[H-Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg(NO₂)]·HBr (XII). 0,19 г (0,16 ммоль) *cyclo[Z-Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg(NO₂)]* [15] растворяли в 3 мл свежеприготовленного 5 М раствора HBr в ледяной CH₃COOH и выдерживали 1 ч при 18° С. Затем добавляли 50 мл безводного эфира, перемешивали до образования осадка, декантировали; обработку эфиром повторяли 4 раза. Фильтровали, осадок выдерживали при 1 мм рт. ст. в присутствии KOH и P₂O₅. Выход 0,18 г (количественный).

Z-(Lys(Z))₃-cyclo[Lys-Pro-Pro-Gly-Phe - Gly - Pro - Phe - Arg(NO₂)] (XIII). К раствору 60 мг (0,06 ммоль) соединения (VI) в 5 мл DMF добавляли 0,33 М раствор HCl в 0,76 мл (0,24 ммоль) тетрагидрофурана. Затем при -40° С добавляли охлажденный раствор 0,007 мл (0,06 ммоль) трет-бутилнитрита в 2 мл DMF. Перемешивали 2 ч при -20° С, определяя завершение реакции с помощью реагента Бартона. Затем при -40° С добавляли 0,04 мл (0,24 ммоль) диизопропилэтиламина до нейтральной реакции (универсальный индикатор) и раствор 70 мг (0,06 ммоль) соединения (XII) и 0,01 мл (0,06 ммоль) диизопропилэтиламина в 3 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 5 сут при -5° С, упаривали до объема 2 мл, к остатку добавляли 30 мл эфира, перемешивали. Образовавшийся осадок отфильтровывали, перемешивали с 30 мл воды, снова отфильтровывали, высушивали при 1 мм рт. ст. в присутствии P₂O₅. Растворяли в 3 мл хроматографической системы А, полученный раствор наносили на колонку с силикагелем (1×22 см, Lobar, Size A, Merck). Элюировали смесью хроматографической системы А с изопропанолом в объемном соотношении 10 : 1, затем 4 : 1. Фракции элюата, содержащие додекапептид, объединяли, упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 49 мг (42%). Т. пл. 130—134° С. $[\alpha]_D^{20}$ -39° (с 0,1, DMF). *R_f* 0(A), 0,64(B), 0,67(B). *k'* 12,7 (Zorbax C₁₈, ацетонитрил — 0,1 М KН₂РO₄ + Н₃РO₄, 55 : 45, рН 2,5).

Lys-Lys-Lys-cyclo[Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe - Arg]·5CH₃COOH (XV). 43,3 мг (0,022 ммоль) соединения (XIII) при 0° С растворяли в смеси 2,0 мл безводного HF (тефлоновая аппаратура) и 0,3 мл анизолы выдерживали 1 ч при этой температуре, упаривали при 0° С, остаток высушивали в эксикаторе в вакууме тефлонового водоструйного насоса в присутствии KOH и H₂SO₄. Затем растворяли в 10 мл воды, раствор обрабатывали в течение 1 ч слабоосновной ионообменной смолой Amberlite IR-4В (Serva, ФРГ) в ацетатной форме, фильтровали, фильтрат лиофилизовали, разделяли на колонке (2,12×25 см) Zorbax C₈, элюент — этанол — 0,2 н. водный ацетат аммония в объемных соотношениях 35 : 65, затем

45:55, 6:4, 9:1. Детектировали при 220 нм, собирали фракции элюата по 20 мл (рис. 1). Фракции 9–12, содержащие додекапептид (XV), объединяли, упаривали при 20° С, остаток растворяли в 10 мл воды и лиофилизовали. Полученный продукт растворяли в воде и снова лиофилизовали до получения пушистого порошка. Выход 16,8 мг (45,9%). $[\alpha]_D^{20} -66,4^\circ$ (с 0,5, вода). R_f 0(A), 0(B), 0(B), 0,97(Г). k' 2,30 (Zorbax C₈, этанол — 0,2 н. раствор ацетата аммония, 35:65). Аминокислотный состав: Lys 4,10 (4), Pro 2,81 (3), Gly 2,00 (2), Phe 2,10 (2), Arg 0,90 (1).

$Z-[Lys(Z)]_3-Leu-Arg(NO_2)-Gly-cyclo[Lys-Pro_2-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg]$ (XIV). 0,13 г (0,1 ммоль) соединения (XI) и 0,15 г (0,2 ммоль) комплекса F [22] растворяли в 5 мл DMF, выдерживали 20 ч при 18° С, затем добавляли 0,11 г (0,1 ммоль) соединения (XII) и 0,3 мл (1,75 ммоль) диизопропилэтиламина. Выдерживали 48 ч при 18° С, упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром, отфильтровывали, затем перемешивали с водой, снова отфильтровывали и высушивали. Растворяли в 5 мл верхней фазы хроматографической системы *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5), наносили на две последовательно соединенные хроматографические колонки (1×22 см, Lobar, Size A, фирма Merck). Элюировали вышеуказанной фазой (рис. 2). Фракции элюата, содержащие пентадекапептид (XIV), объединяли, упаривали, остаток растирали с эфиром. Выход 90,2 мг (38,9%). Т. разл. 149° С. $[\alpha]_D^{20} -42,4^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,13(A), 0,65(B), 0,67(B). k' 13,5 (Zorbax C₁₈, ацетонитрил — 0,1 М КН₂РО₄+Н₃РО₃, 55:45, рН 2,5).

$Lys_3-Leu-Arg-Gly-cyclo[Lys-Pro_2-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg] \cdot 6CH_3COOH$ (XVI). 75 мг (0,032 ммоль) соединения (XIV) и 0,5 мл анизолра растворяли в 2 мл безводного HF. Выдерживали 1 ч при 0° С, затем удаляли HF в вакууме водоструйного насоса. Остаток выдерживали в вакууме в присутствии КОН и конц. Н₂SO₄, затем растворяли в 20 мл воды и обрабатывали 1 г слабоосновной ионообменной смолы Amberlite IR-4В (Serva, ФРГ) в ацетатной форме (1 ч), фильтровали, фильтр лиофилизовали. Полученный продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ в два приема — 43 и 18 мг на колонке (2,12×25 см) Zorbax C₈, элюент — смесь этанола с 0,2 н. водным раствором ацетата аммония, в котором содержание этанола ступенчато меняли (рис. 3). Фракции, содержащие пептид (XVI), упаривали до 1/10 исходного объема, лиофилизовали, полученный продукт растворяли в воде, фильтровали и снова лиофилизовали. Получено 40 мг вещества, однородного по данным обращенно-фазовой ВЭЖХ. При анализе полученного вещества электрофорезом на бумаге обнаружались существенные примеси. Продукт растворяли в 3 мл воды и наносили на колонку с СМ-целлюлозой*. Элюировали водным раствором ацетата аммония (линейный градиент 0,01 н. NH₄OCOSН₃, рН 4,5→0,2 н. NH₄OCOSН₃, рН 6, рис. 4). Лиофилизацией фракции, содержащей пептид (XVI), получено 8,6 мг (13%) хроматографически и электрофоретически однородного пептида. $[\alpha]_D^{20} -70,0^\circ$ (с 0,5, вода). R_f 0(A, Б, В), 1,01(Г). k' 1,39 (Zorbax C₈, этанол — 0,1 н. раствор ацетата аммония, 45:55). Аминокислотный состав: Lys 4,89 (4), Leu 0,79 (1), Arg 1,85 (2), Gly 3,00 (3), Pro 3,07 (3), Phe 1,74 (2).

Определение влияния пептидов на артериальное давление крыс. Беспородных белых крыс обоего пола весом 180–200 г наркотизировали 25% раствором уретапа из расчета 0,5 мл на 100 г веса. Артериальное давление регистрировали из общей сонной артерии с помощью трансдюсера Bentley Trantec Physiological Pressure на двухканальном регистрирующем приборе Gemini (Ugo Basile, Италия). Вещества вводили в бедренную

* 2,0 г СМ-целлюлозы СМ-32 (Whatman) суспендировали в 30 мл 0,5 н. NaOH, выдерживали 30 мин, декантировали и промывали водой до нейтральной реакции, затем суспендировали в 30 мл 0,5 н. HCl, выдерживали 30 мин, декантировали и промывали водой. Обработку 0,5 н. HCl повторяли, промывали водой до нейтральной реакции и переносили в колонку.

вену в виде инъекций в объеме 0,1 мл на 200 г веса животного в дозах 0,1 мг/кг — 1 мг/кг.

Определение миотропной активности. Миотропную активность соединений (XV) и (XVI) изучали в опытах *in vitro* согласно методике ван Россума [23] посредством регистрации изотонических сокращений изолированной матки крысы. Регистрацию сокращений производили с помощью прибора ВИ 6-5 МА в нашей модификации [24, 25]. Агонистические свойства веществ изучены в диапазоне концентраций 10^{-11} — 10^{-5} М. По кумулятивным кривым «концентрация — эффект» рассчитаны параметры, характеризующие взаимодействие веществ с рецепторами α и ρD_2 .

При статистической обработке данных каждое значение определено как среднее из шести опытов с вычислением средней квадратической и средней арифметической ошибки, стандартного отклонения и доверительного интервала при P 0,05. Достоверность различий определена по t -тесту Стьюдента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ovchinnikov Yu., Chipens G., Ivanov V.* In: Peptides 1982. Proc. of the 17-th Eur. Pept. Symp/Eds Blaža K., Malon P. Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1983, p. 1—18.
2. *Чипенс Г. И.* Изв. АИ ЛатвССР, 1983, № 2, с. 30—37.
3. *Нрибу V.* Life Sci., 1982, v. 26, № 3, p. 189—199.
4. *Чипенс Г. И., Полевая Л. К., Веретенишкова Н. И., Крикус А. Ю.* Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980, с. 1—123, 227—246.
5. *Ефремов Е. С., Филатова М. П., Реутова Т. О., Степанова Л. Н., Рейсмани Э., Иванов В. Т.* Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 9, с. 1169—1180.
6. *Филатова М. П., Рейсмани Э., Реутова Т. О., Иванов В. Т., Григорян Г. Л., Шануро А. М., Розанцев Э. Г.* Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 9, с. 1181—1189.
7. *Галактионов С. Г., Шерман С. А., Шендерович М. Д., Никифорович Г. В., Леонова В. И.* Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 9, с. 1190—1197.
8. *Ivanov V. T., Filatova M. P., Reissmann S., Reutova T. O., Efremov E. S., Pashkov V. S., Galaktionov S. G., Grigorian G. L., Ovchinnikov Yu. A.* In: Peptides. Chemistry. Struct. & Biol. Proc. of the 4-th Amer. Pept. Symp/Eds Walter R., Meienhofer J. Ann Arbor: Ann Arbor Sci., 1975, p. 151—157.
9. *Raiva A. C. M., Juliano L.* In: Peptides. Proc. of the 5-th Amer. Pept. Symp/Eds Goodman M., Meienhofer J. N. Y.: J. Wiley & Sons, 1977, p. 337—339.
10. *London R. E., Stewart J. M., Cann J. R., Matwiyoff N. A.* Biochemistry, 1978, v. 17, № 12, p. 2270—2276.
11. *Чипенс Г. И.* Вести. АИИ СССР, 1983, № 2, с. 18—22.
12. *Мисина И. П., Силенiece Ф. О., Мугулис Ф. К., Клуша В. Е., Чипенс Г. И.* В кн.: Тез. докл. конф. фармакологов Прибалтийских республик. Каунас, 1977, с. 61—62.
13. *Chipens G., Mutulis F., Galaktionov S.* In: Frontiers of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology/Ed. Ananchenko S. N. Oxford—New York: Pergamon Press, 1980, p. 99—103.
14. *Chipens G., Nikiforovich G., Mutulis F., Veretennikova N., Vosekalna I., Sosnov A., Polcvaaya L., Ancans J., Mishlyakova N., Liepinsh E., Sckacis J., Breslav M.* In: Peptides. Struct. and Biol. Funct. Proc. of the 6-th Amer. Pept. Symp/Eds Gross E., Meienhofer J. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company, 1979, p. 567—570.
15. *Chipens G. I., Mutulis F. K., Katayev B. S., Klusha V. E., Misina I. P., Myshlyakova N. V.* Int. J. Peptide and Protein Res., 1981, v. 18, № 3, p. 302—311.
16. *Chipens G., Mutulis F., Mishlyakova N.* In: Chemistry of Peptides and Proteins/Eds Voelter W., Wunsch E., Ovchinnikov J., Ivanov V. Walter de Gruyter & Co, 1982, v. 1, p. 269—273.
17. *Mishlyakova N. V., Abolina G. M., Mutulis F. K., Kluša V. E., Chipens G. I.* In: Physiol. and Pharmacol. of Smooth Muscle. Programm and Abstracts of Papers of the 3-rd Int. Symp. Varna, 1982, p. 86.
18. *Pisano J. J.* Fed. Proc., 1968, v. 27, № 1, p. 58—62.
19. *Чипенс Г. И., Мугулис Ф. К., Романовский П. Я., Крикус А. Ю., Ашманис А. А., Ляндо О. Е.* Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 437—446.
20. *Schröder E.* In: Handb. of Exp. Pharm. Bradykinin, Kallidin and Kallikrein/Ed. Erdös E. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1970, v. 25, p. 324—350.
21. *Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I.* Lieb. Ann., 1973, № 9, p. 1421—1429.
22. *Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M. J.* Amer. Chem. Soc., 1967, v. 89, № 1, p. 183—184.
23. *Van Rossum J. M.* Arch. Int. Pharmacodyn., 1963, v. 143, № 3—4, p. 299—330.
24. *Беляков Н. В., Семушин Б. В.* Лаб. дело, 1972, № 10, с. 630—632.
25. *Индуплен Ю. И., Розенблюм А. Б., Клуша В. Е.* Тез. докл. конф. «Вопросы фармакологии психотропных средств». Рига, 1974, с. 49.

Поступила в редакцию
14.XI.1983
После доработки
9.I.1984

**BIOLOGICALLY ACTIVE LOOP-SHAPED ANALOGUES OF BRADYKININ
AND POLISTESKININ**

MUTULE I. E., MUTULIS F. K., LANDO O. E., ASHMANIS A. A.,
GRIGORYEVA V. D., MYSHLYAKOVA N. V., KLUSHA V. E.,
CHIPENS G. I.

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

The classical methods of peptide chemistry have been employed to synthesize loop-shaped derivatives of bradykinin and polisteskinin, Lys-Lys-Lys-[*cyclo*(9→1⁶), Lys⁴, Gly⁶]bradykinin and Lys-Lys-Lys-Leu-Arg-Gly[*cyclo*(9→1⁶)Lys⁴, Gly⁶] bradykinin. In the course of synthesis, the linear «tail» fragments were attached to partially deprotected cyclopeptide. Protective groups were removed by treating with hydrogen fluoride, the end products were purified using reversed-phase and ion exchange chromatography. Biological experiments *in vivo* have revealed that the two compounds elicit a prolonged hypotensive effect in rats which is characteristic of cyclic bradykinin analogues. With the latter compound, a decrease in arterial pressure is preceded by a brief hypertensive action. The loop-shaped analogues are slightly myotropic when applied to rat uterus preparations *in vitro*.