



УДК 547.964.4.057:577.175.829'17.017

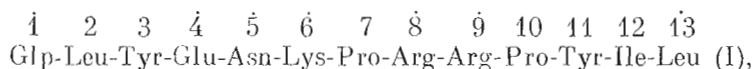
СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ И ЛИНЕЙНЫХ
АНАЛОГОВ ПЕЙРОТЕНЗИНА

Гринштейне И. В., Мышлякова И. В., Вегнер Р. Э.,
Восекама И. А., Гайлите Э. А., Григорьева В. Д.,
Чиненс Г. П.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Синтезированы новые циклические аналоги пейротензина (NT): [cyclo(13→8), Gly⁸]NT-(8-13), [cyclo(13→7), Gly⁷]NT-(7-13), [cyclo(13→5^E), Lys⁵]NT-(5-13), [cyclo(13→4^E), Lys⁴]NT-(4-13) и их линейные предшественники. Защищенные линейные соединения — предшественники циклоаналогов — получены твердофазным методом пептидного синтеза. Циклизация осуществлена с помощью дифенилфосфорилазида. Установлено, что циклизация С-концевых гекса- и октапептидных фрагментов пейротензина приводит к образованию циклоаналогов, проявляющих высокую депрессорную активность. Исследованы спектры КД полученных соединений. Показано, что в водном растворе циклогексапептидный аналог пейротензина имеет относительно жесткую конформацию, которая отличается от конформации соответствующего линейного соединения и фрагмента NT-(9-13), а нейротензин, его циклогепта- и циклооктапептидные аналоги имеют неупорядоченную структуру.

Молекула нейротензина (I) содержит ряд потенциальных центров квазициклизации (отмечены точками)



которые могут участвовать в фиксации пространственной структуры биологически активных конформеров [1]. В пользу такой возможности говорит высокая депрессорная активность циклических аналогов соответствующих С-концевых гекса- и октапептидных фрагментов [2].

В продолжение исследований циклических аналогов нейротензина мы предприняли синтез и изучение биологических свойств циклонона- и циклодекапептидов ((II), (III), табл. 1), моделирующих потенциальные квазициклические структуры, которые могут образовываться при взаимодействии боковых цепей аминокислотных остатков нейротензина в положении 4 или 5 с С-концевым лейцином. Пространственная структура этих соединений фиксировалась за счет создания пептидной связи между С-концевой карбоксильной и ε-аминогруппой лизина, введенного в N-концевое положение фрагментов нейротензина 4-13 и 5-13. Так как С-концевая часть молекулы нейротензина наиболее важна для проявления биологической активности [3-5], были синтезированы также циклические аналоги его пента- и гексапептидных фрагментов, в которых цикл замыкали амидной связью между α-аминогруппой N-концевого глицина и С-концевой карбоксильной группой ((IV), (V), табл. 1). Получены также предшественники циклопептидов — линейные аналоги С-концевых фрагментов нейротензина и немодифицированные С-концевые пента- и гексапептидные его фрагменты ((IX), (X), табл. 1).

Для синтеза намеченных соединений использовали Вос-аминокислоты; оксигруппу тирозина защищали бензильной группой, гуанидиногруппу

Принятые сокращения: NT — нейротензин, DMF — диметилформамид, DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, НОВТ — 1-оксибензотриазол, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, TFE — трифторэтанол, TFA — трифторуксусная кислота, Et₃N — триэтиламин.

Депрессорный эффект (мм рт. ст.) аналогов и фрагментов нейротензина на артериальное давление наркотизированных крыс (наркоз этионалом натрия)

Соединение	Номер	Доза, нмоль/кг				И *
		0,5	5,0	50	500	
Glp-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	(I)	34,5±2,5	49,5±0,5	63,0±4,1	**	1
<i>cyclo</i> (H ¹ -Leu-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-)	(II)	0	34,0±8,4	49,4±5,7	54,0±6,4	0,1
<i>cyclo</i> (H ¹ -Lys-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-)	(III)	0	0	0	48,5±1,5	0,1
<i>cyclo</i> (-Gly-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-)	(IV)	0	0	46,5±6,5	43,0±6,9	1
<i>cyclo</i> (-Gly-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-)	(V)	17,0±2,0	28,0±5,0	44,0±2,0	76,0±3,0	60
H-Lys-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	(VI)	35,0±2,2	29,8±1,7	40,5±1,5	59,0±5,6	0,6
H-Gly-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	(VII)	0	29,3±3,9	42,0±5,0	60,5±2,5	0,6
H-Gly-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	(VIII)	25,0±4,0	55,0±4,0	72,0±3,0	81,0±2,0	10
H-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	(IX)	12,7±3,5	43,5±0,4	53,0±1,0	58,5±4,6	5
H-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	(X)	0	5,0±0,4	48,0±6,0	67,0±3,0	5
H-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH	(XI)	26,0±7,0	49,0±1,0	53,0±1,0	52,0±2,0	8 [2]
<i>cyclo</i> (H ¹ -Phe-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-)	(XII)	26,0±2,0	41,0±5,0	**	**	80 [2]

* Стояние между депрессорной и мистрольной активностями соединения, выраженными в процентах от соответствующих активностей нейротензина.

** При этих дозах соединения не исследовались.

аргинина — нитрогруппой. Для защиты α - и ϵ -аминофункций лизина использовали комбинацию бензилоксикарбонильной и Вос-групп: Вос-Lys(Z) и Z-Lys(Вос).

Твердофазный синтез проводили в автоматическом пептидном синтезаторе «Beckman 990 В» на хлорметилированном полимерном носителе, используя симметричные ангидриды Вос-аминокислот, полученные карбодимидным методом; непрореагировавшие аминогруппы пептидил-полимера ацетилировали как было описано ранее [2]. Остаток аспарагина присоединяли к пептидилполимеру ДСС-НОВТ-методом [6].

Синтезированные пептиды ((XIII) — (XVIII), табл. 2) отщепляли от полимера щелочным омылением [7]. Линейные пептиды (VI) — (X) получали из соответствующих защищенных соединений ((XIV) — (XVIII), табл. 2) после отщепления Вос-группы и последовательного каталитического гидрогенолиза. Циклизацию пептидов проводили с помощью дифенилфосфорилиазида [8] после селективного отщепления Вос-группы с N-концевого аминокислотного остатка. Промежуточные продукты после снятия с полимера и циклизации очищали распределительной хроматографией на силикагеле. Защитные группы после циклизации также удаляли каталитическим гидрогенолизом. Конечные продукты очищали ВЭЖХ.

Проведение биологических испытаний синтезированных соединений в опытах *in vivo* (депрессорная активность пептидов у наркотизированных крыс) и *in vitro* (сокращение гладкой мускулатуры подвздошной кишки морской свинки) показало (табл. 1, рис. 1), что наибольшей депрессорной активностью среди циклоаналогов обладает циклогептапептид (V). В низких концентрациях это соединение в несколько раз активнее фрагмента NT-(8—13) (X) и лишь незначительно уступает по активности линейному соединению (VIII), которое отличается от соединения (V) наличием двух функциональных групп ($-NH_2$ и $-COOH$). Депрессорная активность циклононапептида (II) и циклодекапептида (III) составляет соответственно лишь ~10 и 1% активности нейротензина, т. е. увеличение размера цикла у аналогов нейротензина приводит к снижению депрессорной активности.

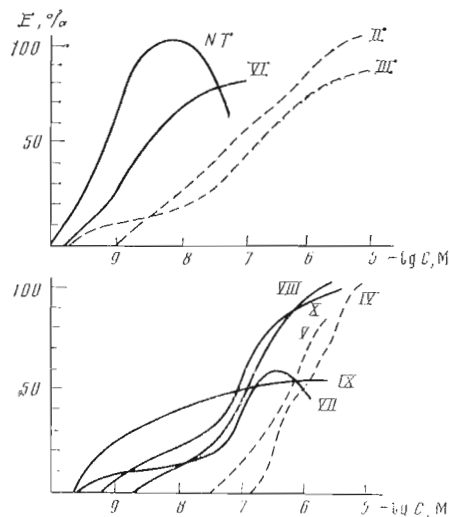


Рис. 1. Мнотропная активность фрагментов и аналогов нейротензина. Приведены кривые «концентрация — эффект»

гидрогенолизом. Конечные продукты

Таблица 2

Характеристика промежуточных продуктов после отщепления от полимерного носителя и распределительной хроматографии на силикагеле

Соединение	Номер	Выход, рассчитанный на первую аминокислоту, %	R_f
Z-Lys(Вос)-Lys(Z)-Pro-Arg(NO ₂)-Arg(NO ₂)-Pro-Tyr(Bzl)-Ile-Leu-OH	(XIII)	31	0,5 (А) 0,7 (Б)
Z-Lys(Вос)-Asn-Lys(Z)-Pro-Arg(NO ₂)-Arg(NO ₂)-Pro-Tyr(Bzl)-Ile-Leu-OH	(XIV)	36	0,15 (Б)
Вос-Gly-Arg(NO ₂)-Pro-Tyr(Bzl)-Ile-Leu-OH	(XV)	45	0,5 (А)
Вос-Gly-Arg(NO ₂)-Arg(NO ₂)-Pro-Tyr(Bzl)-Ile-Leu-OH	(XVI)	36	0,5 (Г)
Вос-Arg(NO ₂)-Pro-Tyr(Bzl)-Ile-Leu-OH	(XVII)	51	0,8 (Г)
Вос-Arg(NO ₂)-Arg(NO ₂)-Pro-Tyr(Bzl)-Ile-Leu-OH	(XVIII)	46	0,7 (А) 0,6 (Г)

Многоступенчатая активность этих соединений меняется противоположно, о чём свидетельствует увеличение параметра pD_2^* : для (V) $6,37 \pm 0,43$ ($\alpha 0,82 \pm \pm 0,10$), для (II) $6,79 \pm 0,45$ ($\alpha 0,79 \pm 0,16$), для (III) $6,86 \pm 0,16$ ($\alpha 1,03 \pm \pm 0,03$). Таким образом, циклоаналоги коротких фрагментов нейротензина более селективно действуют на вазальную, а циклоаналоги длинных фрагментов — на экстравазальную мускулатуру.

Результаты биологических испытаний полученных вазоактивных циклоаналогов фрагментов нейротензина свидетельствуют в пользу предположения о существовании квазициклической биологически активной конформации у С-концевой части его молекулы. Предполагается, что такой квазицикл или петля с наибольшей вероятностью образуется при взаимодействии боковых цепей Lys^6 или Arg^8 с С-концевой карбоксильной группой, так как циклоаналоги этих фрагментов ((V), (XII), табл. 1) показали более высокий депрессорный эффект и избирательность действия.

Проведенный ранее анализ структур соединений белково-пептидной природы, содержащих дисульфидные циклы и потенциальные квазициклы, показал, что среди них в основном преобладают структуры, включающие в состав цикла 6—10 аминокислотных остатков [1]. Полученные нами результаты показали, что оптимальная величина квазицикла в случае нейротензина также составляет 6—8 аминокислотных остатков.

С целью выяснения влияния вышеупомянутых структурных модификаций на пространственное строение аналогов фрагментов нейротензина нами исследованы спектры КД нейротензина, его линейных и циклических аналогов в воде и трифторэтаноле. Согласно литературным данным, молекула нейротензина в растворе додецилсульфата натрия не имеет определенной структуры [10]. Спектры КД нейротензина (I) **, соединения (VI) и циклоаналога (II) в воде однотипны и отвечают пептидам с неупорядоченной конформацией [11]. Для них характерно наличие широкого отрицательного минимума при 195 нм, обусловленного $\pi \rightarrow \pi'$ -переходом амидных хромофоров, на который влияет 1B -переход ароматических хромофоров [12], и плеча при 234—235 нм, отражающего влияние $n \rightarrow \pi'$ -перехода амидных, а также 1L_a -перехода ароматических хромофоров (рис. 2, 1, 3, 5). Спектр КД нейротензина в TFE свидетельствует о наличии у этого соединения существенной доли спиральной структуры (рис. 2, 2): кривая спектра КД обнаруживает тенденцию к образованию положительного максимума при 196 нм, видны отрицательные минимумы при 205 и 220 нм. Соединение (VI) в TFE не имеет определенной конформации, несмотря на то что при 220 нм на кривой 4 (рис. 2) проявляется плечо.

Линейный и циклический аналоги (V) и (VIII) в водных растворах имеют спектры КД, характерные для пептидов с неупорядоченной конформацией (рис. 3, 1, 2). Линейные соединения (VII) и (IX) в водных растворах не проявляют признаков формирования определенной пространственной структуры (рис. 4, 1, 5), но в TFE эта тенденция наблюдается (рис. 4, 2, 6). Более отчетливо это проявляется после фиксации изогнутой пептидной цепи с помощью циклизации (соед. IV). Циклоаналог (IV), как и ранее полученное соединение (XII) [2], имеет относительно жесткую конформацию, так как спектры КД этих соединений существенно не меняются при переходе от водного раствора к TFE (рис. 3, 4, 3, 4). Переход 1L_b ароматического хромофора тирозина у соединения (IV) проявляется в виде однопиковых дихроичных полос поглощения с одинаковыми знаками (в воде $[\theta]_{275} 1,44 \cdot 10^2$, в TFE $[\theta]_{275} 3,8 \cdot 10^2$), что свидетельствует об одинаковом окружении ароматического хромофора в обоих растворителях.

Таким образом, в отличие от брадикинина, для которого спектры КД циклических и линейных аналогов в водных растворах имеют определен-

* α — внутренняя активность, характеризующая способность вещества вызывать эффект, pD_2 — показатель специфического сродства, характеризующий способность вещества взаимодействовать с рецептором. Оба параметра рассчитаны согласно [9].

** Для спектров КД использовали синтетический препарат нейротензина фирмы Sigma (США).

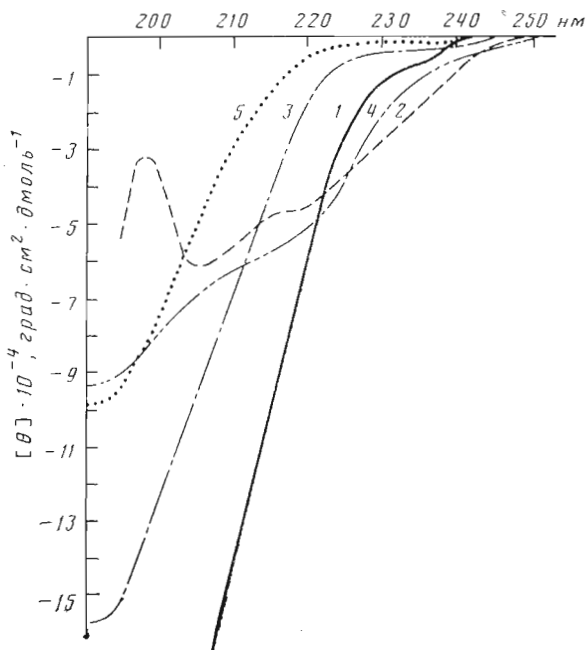


Рис. 2. Спектры КД нейротензина (1, 2) и его циклических аналогов (IV) (3, 4) и (II) (5) в воде (1, 3, 5) и TFE (2, 4)

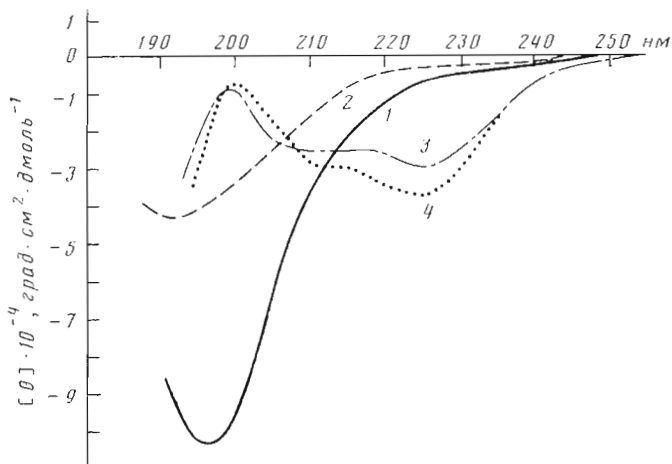


Рис. 3. Спектры КД линейного (VIII) (1) и циклических аналогов (V) (2), (XII) (3, 4) в воде (1-3) и TFE (4)

ное сходство [13], спектры КД водных растворов циклических гекса- и октапептидных аналогов NT и соответствующих линейных соединений значительно различаются.

Экспериментальная часть

Для синтеза использовали хлорметилированный полимерный носитель Bio-Beads™ S-XI (Bio-Rad, США) с начальной емкостью 4,2 мэкв/г, производные L-аминокислот фирм Reanal (ВНР) и Fluka (Швейцария).

Индивидуальность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄. Колоночную хроматографию осуществляли на колонках с силикагелем LiChroprep™ Si 60, Lobar Size B 310-25 (A) и Size C 440-37 (B) фирмы Merck. Для очистки и характеристики хроматографической подвижности (R_f) пепти-

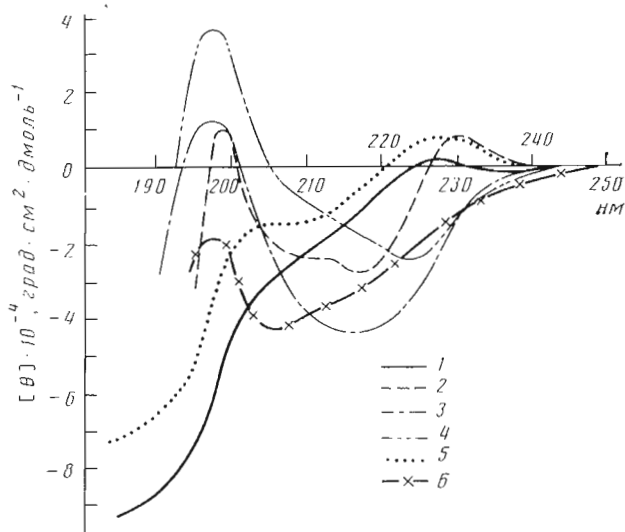


Рис. 4. Спектры КД линейных (VII) (1, 2), (IX) (3, 4) и циклического (IV) (5, 6) аналогов в воде (1, 3, 5) и TFE (2, 4, 6)

дов применяли системы: хлороформ — метанол — уксусная кислота, 9,0 : 0,5 : 0,5 (А), *n*-бутанол — этанол — вода — уксусная кислота, 80 : 10 : 30 : 5 (Б), этилацетат — уксусная кислота — *n*-бутанол — вода, 2 : 1 : 1 : 1 (В), *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 : 2 (Г), *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 15 : 10 : 3 : 2 (Д), хлороформ — метанол — *n*-бутанол — этилацетат — вода, 10 : 6 : 4 : 1 : 1 (Е).

Электрофоретическую подвижность по отношению к гистидину (E_{His}) определяли на бумаге FN-15 в 5 н. уксусной кислоте, рН 1,9. Вещества обнаруживали в УФ-свете, а также с помощью реагентов Паули, Сакагучи, нингидрина и хлорбензидина.

Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Biocal BC-200 (ФРГ) после 24-часового гидролиза пептидов в запаянной ампуле при 110° С в 6 н. HCl с добавлением 1% фенола.

Удельное вращение определяли на поляриметре Perkin-Elmer 141 (США).

ВЭЖХ осуществляли на приборе Du Pont (США) с использованием колонки Zorbax C₈ (2,12×25 см) (В). Контроль за ходом элюции при препаративном хроматографическом разделении пептидов осуществляли по изменению оптического поглощения элюата, которую регистрировали с помощью проточной ячейки Uvicord III (Швеция) при 254 нм.

Растворители упаривали в вакууме на ротационном испарителе при температуре не выше 40° С.

Спектры КД записывали на дихрографе Mark III фирмы Jobin-Ivon (Франция). Дихрограф калибровали по стандартам — эпиадростерону и 10-камфорсульфоново́й кислоте. Для записи спектров использовали кварцевые кюветы фирмы Hellma с длиной оптического пути 1 см в спектральном диапазоне 250—300 нм и 0,1—0,01 см в области 180—250 нм. Концентрации растворов составляли 10⁻³—10⁻⁴ М. Полученные спектры обрабатывали на ЭВМ Wang 2200 VP (США) с устройством ввода графической информации с помощью специально разработанного пакета программ [14]. Молекулярную эллиптичность [θ] измеряли в град·см²/дмоль.

Вос-Leu-полимер. 7,8 г (21 ммоль) цезиевой соли Вос-Leu и 5 г полимера в 150 мл DMF перемешивали 12 ч при 50° С, согласно методике Гизина [15]. Полимер отфильтровывали, на фильтре промывали этанолом, эфиром и сушили в вакуумном эксикаторе в присутствии P₂O₅ и KOH. Содержание лейцина, согласно данным аминокислотного анализа, составляло 3,4 ммоль/г полимера.

Твердофазный синтез пептидов (XIII)–(XVIII) и ацелирование пепторегировавших аминокрупп пептидил-полимера проводили исходя из 5 г Вос-Leu-полимера по программам № 1 и 2, описанным ранее [2]. Симметричные ангидриды Вос-аминокислот получали непосредственно перед введением в реакцию. Для этого 34 ммоль Вос-аминокислоты растворяли в 30 мл CH_2Cl_2 , охлаждали до 0°C , добавляли 17 мл 1 М раствора DCC в CH_2Cl_2 и выдерживали 30 мин при 2°C . Раствор фильтровали и вносили в реакционный сосуд синтезатора. Для Вос-Arg(NO_2), Z-Lys(Вос), Вос-Lys(Z) в качестве растворителя применяли смесь CH_2Cl_2 – DMF (5:1), а для Вос-Asn – смесь CH_2Cl_2 – DMF (1:1). Вос-Asn присоединяли к пептидил-полимеру карбодимидным методом, добавляя в реакционную массу 1 экв. НОВТ, по программе № 3 (табл. 3).

Отщепление от полимера и очистка пептидов (XIII)–(XVIII). 5 г пептидил-полимера сусендировали в 50 мл раствора, содержащего 40,5 мл этанола и 4,5 мл 2 н. NaOH, и перемешивали 2 ч при 20°C . Полимер отфильтровывали, фильтрат подкисляли 1 М H_2SO_4 до pH 3. Растворитель упаривали, остаток растворяли в *n*-бутаноле и фильтровали. Фильтрат упаривали и остаток растирали с безводным эфиром.

Защищенные промежуточные соединения (XIII)–(XVIII), полученные после отщепления от полимера, растворяли в 10 мл хроматографической системы А (соед. (XIII)–(XV), (XVII)–(XVIII)) или В (соед. (XVI)) и наносили на колонку Б. Соединения (XV), (XVII) и (XVIII) элюировали системой А; соединение (XVI) – системой В; соединение (XIV) – системой А, потом Б; соединение (II) – системой А, потом В. Фракции, содержащие соответствующий пептид, объединяли, упаривали и растирали с безводным эфиром. Хроматографические подвижности (R_f) и выходы пептидов представлены в табл. 2.

Lys-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu — (II). 300 мг (0,2 ммоль) соединения (XIII) растворяли в 20 мл 50% раствора TFA в CH_2Cl_2 и выдерживали 1 ч при 20°C . Раствор упаривали, остаток растирали с безводным эфиром. Полученный продукт сушили в вакуумном эксикаторе над КОН. Выход 290 мг (97%), R_f 0,31 (Б).

200 мг (0,11 ммоль) полученного трифторацетата защищенного нонапептида растворяли в 20 мл DMF, добавляли 0,1 мл (0,6 ммоль) диизопропилэтиламина, охлаждали реакционную смесь до -25°C , добавляли 0,05 мг (0,2 ммоль) дифенилфосфорилазида и выдерживали 48 ч при -10°C , 48 ч при 2°C и 48 ч при 20°C . Раствор упаривали, остаток растворяли в *n*-бутаноле и растирали с безводным эфиром. Полученный продукт растворяли в 5 мл хроматографической смеси А, наносили на колонку А и элюировали системой А. Фракции элюата, содержащие защищенный циклопептид, объединяли, упаривали и растирали с безводным эфиром. Выход 130 мг (74%), R_f 0,69 (Б), 0,33 (А).

130 мг защищенного циклопептида растворяли в 10 мл смеси метанол – уксусная кислота – вода (6:1:1) и гидрировали над палладиевой чернью 48 ч. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали. Остаток растворяли в 1 мл метанола и растирали с безводным эфиром. Полученный продукт очищали ВЭЖХ. Элюировали ступенчатым градиентом (28% и 50%) CH_3CN в 0,2 М AcONH_4 , далее смесью изопропанол – 0,2 М AcONH_4 (7:3). Фракции, содержащие циклопептид (II), упаривали и лиофилизировали. Выход 16,5 мг (19%), R_f 0,29 (Д), E_{His} 1,1, $[\alpha]_D^{20}$ $-41,2^\circ$ (с 0,4, метанол). Аминокислотный анализ: Pro 2,50 (2), Leu 0,88 (1), Ile 0,95 (1), Tyr 0,75 (1), Lys 2,44 (2), Arg 1,66 (2).

H-Lys-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu — (III) получали из соединения (XIV) аналогично соединению (II). Выход трифторацетата защищенного липейного декапептида 95%, R_f 0,11 (В). Защищенный промежуточный продукт циклопептида (III) очищали на колонке А в системе Б (выход 37%, R_f 0,53 (Б)); свободный циклопептид (III) выделяли ВЭЖХ. Элюировали смесью CH_3CN и 0,2 М AcONH_4 в объемных соотношениях 15:85, 25:75, 30:70, 40:60, 50:50 и 60:40. Выход 23%, R_f 0,83 (Г), 0,45 (Д), E_{His} 0,73, $[\alpha]_D^{20}$ -15° (с 0,2, метанол). Аминокислотный анализ:

Программа твердофазного синтеза пептидов DCC-НОВТ-методом (№ 3)

Номер линии	Операция	Используемый реагент	Объем реагента, мл	Время перемешивания, мин
1	Промывка	CH ₂ Cl ₂	80×2	1,5
2	»	50% TFA/CH ₂ Cl ₂	80	5,0
3	Деблокирование	50% TFA/CH ₂ Cl ₂	80	40,0
4	Промывка	CH ₂ Cl ₂	80×6	1,5
5	Нейтрализация	20% Et ₃ N/CH ₂ Cl ₂	80×2	1,5
6	Промывка	CH ₂ Cl ₂	80×8	1,5
7	Внесение Boc-Asn	Boc-Asn/CH ₂ Cl ₂ — DMF	30	1,5
8	Внесение НОВТ	2М НОВТ/CH ₂ Cl ₂	17	1,5
9	Внесение DCC	2М DCC/CH ₂ Cl ₂	17	1,5
10	Реакция конденсации			120,0
11	Промывка	CH ₂ Cl ₂	80×3	1,5
12	Переход к 1-й линии программы № 2			

Asp 0,69 (1), Pro 2,00 (2), Ile 0,68 (1), Leu 0,71 (1), Tyr 0,64 (1), Lys 2,02 (2), Arg 1,52 (2).

$\text{—Gly-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu—}$ (IV) получали из соединения (XV) аналогично соединению (II). Защищенный промежуточный продукт циклопептида (IV), полученный после циклизации трифторацетата линейного защищенного гексапептида (R_f 0,45, Г), очищали на колонке А в системе Б. Выход 36%, R_f 0,69 (Б). Циклопептид (IV) выделяли ВЭЖХ. Элюировали смесью CH₃CN и 0,2 М AcONH₄ в объемных соотношениях 35 : 65 и 50 : 50. Выход соединения (IV) 37%, R_f 0,5 (Г), E_{HIS} 0,6, $[\alpha]_D^{20} -52^\circ$ (c 0,1, метанол). Аминокислотный анализ: Pro 0,89 (1), Gly 1,00 (1), Ile 0,86 (1), Leu 0,87 (1), Arg 0,97 (1).

$\text{—Gly-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu—}$ (V) получали из соединения (XVI) аналогично соединению (II). Выход трифторацетата защищенного линейного гептапептида 98%, R_f 0,12 (Г).

Защищенный промежуточный продукт циклопептида (V) очищали на колонке А в системе В, выход 24%, R_f 0,4 (Г). Свободный циклопептид (V) очищали ВЭЖХ. Элюировали смесью CH₃CN — 0,2 М AcONH₄ (23 : 77, процентное соотношение). Выход 21%, R_f 0,48 (Г), E_{HIS} 0,7, $[\alpha]_D^{20} -80,5^\circ$ (c 0,1, метанол). Аминокислотный анализ: Pro 1,21 (1), Gly 1,00 (1), Ile 0,87 (1), Leu 0,91 (1), Tyr 0,52 (1), Arg 1,84 (2).

H-Lys-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH (VI) получали деблокированием соединения (XIV) в условиях, описанных в синтезе соединения (II), и очищали ВЭЖХ. Элюировали смесью CH₃CN и 0,2 М AcONH₄. Содержание CH₃CN в смеси составляло 16 и 50%. Выход 41%, R_f 0,24 (Г), 0,18 (Д), E_{HIS} 1,0, $[\alpha]_D^{20} -22,5^\circ$ (c 0,1, метанол).

H-Gly-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH (VII) получали из соединения (XV) аналогично синтезу соединения (VI) и очищали ВЭЖХ. Элюировали смесью 26% CH₃CN и 74% 0,2 М AcONH₄. Выход 45%, R_f 0,45 (Д), 0,33 (Г), E_{HIS} 0,71, $[\alpha]_D^{20} -25^\circ$ (c 0,1, метанол).

H-Gly-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH (VIII) получали из соединения (XVI) аналогично соединению (VI) и очищали ВЭЖХ. Элюировали смесью CH₃CN и 0,2 М AcONH₄ в объемных соотношениях 13 : 87 и 25 : 75. Выход 27%, R_f 0,18 (Г), E_{HIS} 0,81, $[\alpha]_D^{20} -33^\circ$ (c 0,1, метанол).

H-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH (IX) получали из соединения (XVII) аналогично синтезу соединения (VI) и очищали ВЭЖХ. Элюировали смесью CH₃CN и 0,2 М AcONH₄ в объемных соотношениях 10 : 90, 20 : 80, 30 : 70, 50 : 50. Выход 57%, R_f 0,3 (Г), E_{HIS} 0,71, $[\alpha]_D^{20} -27^\circ$ (c 0,3, метанол). Аминокислотный анализ: Pro 1,20 (1), Ile 1,00 (1), Leu 0,97 (1), Tyr 0,92 (1), Arg 0,93 (1).

H-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH (X) получали из соединения (XVIII) аналогично синтезу соединения (VI) и очищали ВЭЖХ. Элюировали смесью CH₃CN и 0,2 М AcONH₄ в объемных соотношениях 10 : 90, 20 : 80,

30 : 70 и 50 : 50. Выход 32%, R_f 0,24 (Г), $E_{\text{ннс}}$ 0,6, $[\alpha]_D^{20}$ $-47,5^\circ$ (с 0,2, метанол). Амипокислотный анализ: Pro 1,08 (1), Ile 1,24 (1), Leu 1,15 (1), Tyr 0,87 (1), Arg 1,85 (2).

Определение депрессорной активности. Влияние синтезированных соединений на артериальное давление изучали по общепринятой методике на беспородных крысах-самцах массой 180–220 г, паркотизированных этампиналом натрия (50 мг/кг). В экспериментах использовали только тех крыс, артериальное давление которых было 120–140 мм рт. ст. Исследуемое вещество вводили в виде отдельных инъекций в бедренную вену. Артериальное давление измеряли в общей сонной артерии при помощи датчика (Bentley Trantec Physiological Pressure Transducer) на двухканальном самописце Gemini (Италия). Эффект выражали в мм рт. ст. В качестве стандартного соединения использовали синтетический препарат нейротензина фирмы Sigma (США).

Миотропный эффект исследуемых соединений определяли на изолированной подвздошной кишке морских свинок по методике, описанной ранее [16]. Результаты обработаны статистически с вычислением стандартной средней арифметической ошибки [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Чипенс Г. И., Полевая Л. К., Веретенникова Н. И., Крикис А. Ю. В кн.: Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980, с. 11–124.
2. Гринштейне И. В., Мисиня И. П., Вегнер Р. Э., Восекална И. А., Гайлите З. А., Григорьева В. Д., Чипенс Г. И. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 9, с. 1167–1178.
3. Carraway R. E., Leeman S. E. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 19, p. 6854–6861.
4. Bisette G., Manberg P., Nemeroff C. B., Prange A. J. Life Sci., 1978, v. 23, № 22, p. 2173–2182.
5. Quiron R., Rioux F., Regoli D. Can. J. Physiol. Pharmacol., 1978, v. 56, № 4, p. 671–673.
6. Wolters E. T. M., Tesser G. I. J. Org. Chem., 1974, v. 39, № 23, p. 3388–3397.
7. Merrifield R. B. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 14, p. 2149–2152.
8. Brady S. F., Varga S. I., Freidinger R. H., Schwenk D. A., Mendlowski M., Holly F. W., Veber D. F. J. Org. Chem., 1979, v. 44, № 18, p. 3101–3105.
9. Van Rossum J. M. Arch. Int. Pharmacodyn., 1963, v. 143, № 3–4, p. 299–330.
10. Wu Ch.-Ch. C., Ikeda K., Yang J. Ts. Biochemistry, 1981, v. 20, № 3, p. 566–570.
11. Greenfield N., Fasman F. D. Biochemistry, 1969, v. 8, № 10, p. 4180–4116.
12. Klevens H. B., Platt J. R. J. Chem. Phys., 1949, v. 17, p. 470–481.
13. Chipens G. I., Mutulis F. K., Katayev B. S., Klusha V. E., Misina I. P., Myshlyakova N. V. Int. J. Pept. Protein. Res., 1981, v. 18, p. 302–311.
14. Караев В. С., Голендер В. Е., Силус Я. Я. Применение ЭВМ в спектроскопии кругового дихроизма. 4-я Международная конференция по применению ЭВМ в химии, 1978, Новосибирск, с. 1–29.
15. Gisin B. F. Helv. chim. acta, 1975, v. 56, № 5, p. 1476–1482.
16. Баев В. В., Мирошников А. И., Клуша В. Е., Мисиня И. П. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 379–385.
17. Беленький М. Л. В кн.: Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Рига: Изд. АИ ЛатвССР, 1959, с. 17–18.

Поступила в редакцию
3.VI.1985

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF CYCLIC AND LINEAR NEUROTENSIN ANALOGUES

GRINSHTEINE I. V., MISHLYAKOVA N. V., VEGNER R. E.,
VOSEKALNA I. A., GAILITE E. A., GRIGORIEVA V. D., CHIPENS G. I.

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

New cyclic analogues of neurotensin (NT): [*cyclo*(13→8), Gly⁶]NT-(8–13), [*cyclo*(13→7), Gly⁷]NT-(7–13), [*cyclo*(13→5*), Lys⁵]NT-(5–13), [*cyclo*(13→4*), Lys⁴]NT-(4–13), and their linear precursors have been synthesized. The latter (protected linear compounds) were prepared by solid-phase peptide synthesis, and cyclization was attained by using diphenylphosphoryl azide. Cyclization of C-terminal hexa- and octapeptide fragments of NT was found to lead to cycloanalogs possessing high depressor activity. As judged by CD spectral data in aqueous solution, the cyclohexapeptide analogue has a relatively rigid conformation different from its linear counterpart and the NT-(9–13) fragment, whereas NT, its cyclohepta- and cyclonona-peptides have random structure.