



УДК 577.175.853'17 : 547.964.4.057

ЭФФЕКТИВНЫЙ СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ БРАДИКИНИНА

Мутуле И. Э., Мутулс Ф. К., Эрглис Д. П.,
Якстис Д. А.*, Секацис И. П., Розите С. Х.,
Григорьева В. Д., Мисиня И. П., Чиневс Г. П.*

*Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР;
*Экспериментальный завод Института органического синтеза
Академии наук ЛатвССР, Рига*

Классическими методами пептидной химии в растворе синтезированы [cyclo(9 → 1^ε), Lys¹, Gly⁶]брадикинин (ЦБК) и цикло-ε-каллидин (ЦК). Для получения линейных предшественников циклопептидов использована конденсация фрагментов по схеме (3 + 3 или 4) + 3. Образование пептидных связей, включая реакцию циклизации, проводилось в основном с использованием пентафторфениловых эфиров производных аминокислот и пептидов. Выход циклизации ~60%. Защищенные циклопептиды выделены хроматографией на силикагеле. Последующее снятие защитных групп осуществлено обработкой жидким HF в присутствии анизола. Очистка ЦБК проведена противоточной капельной хроматографией, а ЦК — высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографией.

Пространственная структура тканевого гормона брадикинина ранее исследовалась главным образом различными физико-химическими и спектроскопическими методами с использованием в качестве модельных соединений его линейных аналогов [1—3]. В результате этих исследований, а также конформационных расчетов [4] была предложена свернутая квазициклическая структура со сближенными концами молекулы [5]. Недавно изучением ЯМР-спектров брадикинина в дейтерированном диметилсульфоксиде нами подтверждено существование солевого мостика, соединяющего N-концевую аминогруппу и C-концевую карбоксильную группу гормона [6]. Предполагалось также, что подобная конформация может существовать в неполярной биофазе рецептора [7].

Для фиксации предполагаемой «биологически активной» конформации брадикинина мы синтезировали ряд его циклических аналогов [8—10]. При исследовании этих соединений установлено, что пространственное строение молекулы Lys¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Gly⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹-([cyclo(9 → 1^ε), Lys¹, Gly⁶]брадикинин, ЦБК) практически не отличается от структуры природного гормона в наиболее распространенных конформациях [8, 11]. Показано, что многие циклические производные брадикинина обладают своеобразным биологическим действием. Они вызывают пролонгированный гипотензивный эффект у крыс и в то же время проявляют лишь слабую миотропную активность (за исключением цикло-ε-каллидина (ЦК)**, который обладает более выраженным действием). Им свойственна также яркая видовая специфичность [12]. Таким образом, для изучения молекулярного строения и механизма биологического действия брадикинина и каллидина нами использованы новые модельные соединения — их циклические аналоги.

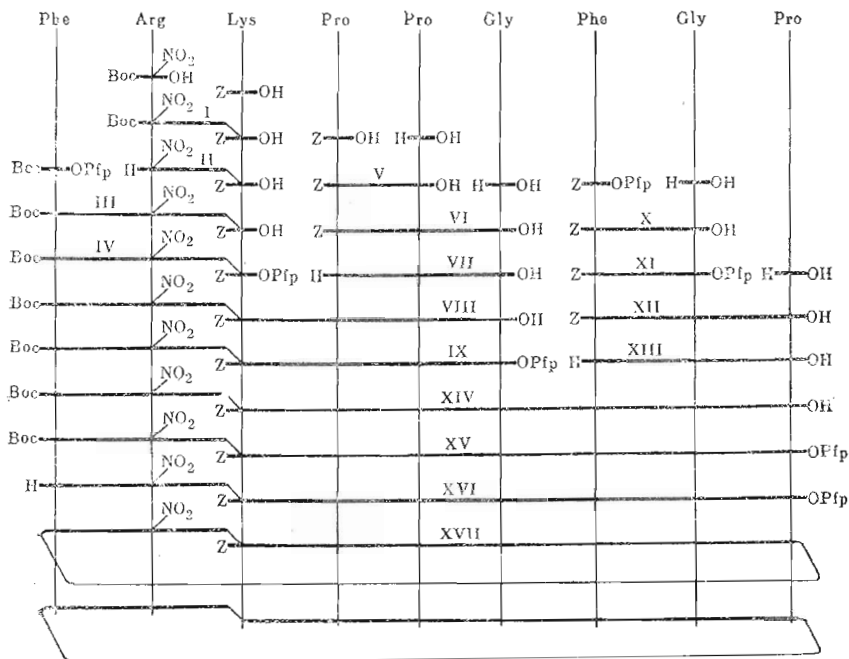
Однако препятствием для широкого изучения этих соединений являлась их труднодоступность, которая обусловлена главным образом низ-

Сокращения: ЦБК — [cyclo(9 → 1^ε), Lys¹, Gly⁶]брадикинин, ЦК — цикло-ε-каллидин или [cyclo(10 → 1^ε)]Lys-брадикинин, Вос — *tert*-бутоксикарбонил, ДСНА — дидиклогексиламин, DMF — диметилформамид, PⁿF — пентафторфенил, Tos — *n*-толуолсульфонил, Z — бензилоксикарбонил.

**Lys¹-Arg²-Pro³-Pro⁴-Gly⁵-Phe⁶-Ser⁷-Pro⁸-Phe⁹-Arg¹⁰.

ким выходом на стадии циклизации (10% для ЦБК [8] и 8% для ЦК [9]). Поэтому мы разработали новые схемы синтеза ЦБК и ЦК, особенностью которых является замыкание цикла через остатки пролина и фенилаланина. Процесс циклизации проведен ступенчато, по схеме пентафторфениловый эфир Вос-пептида → гидрохлорид пентафторфенилового эфира пептида → циклопептид. Образование цикла проводилось в диоксановом растворе, так как диоксан легче получить в чистом виде, чем используемый ранее диметилформамид. В результате удалось многократно (до 50—60%) повысить выход на стадии циклизации. Кроме того, разработанные схемы синтеза позволили для наработки ЦК использовать также некоторые промежуточные соединения получения ЦБК. По сравнению с первоначальными схемами синтезов сокращено применение относительно труднодоступных *tert*-бутиловых эфиров глицина и пролина.

Схема 1



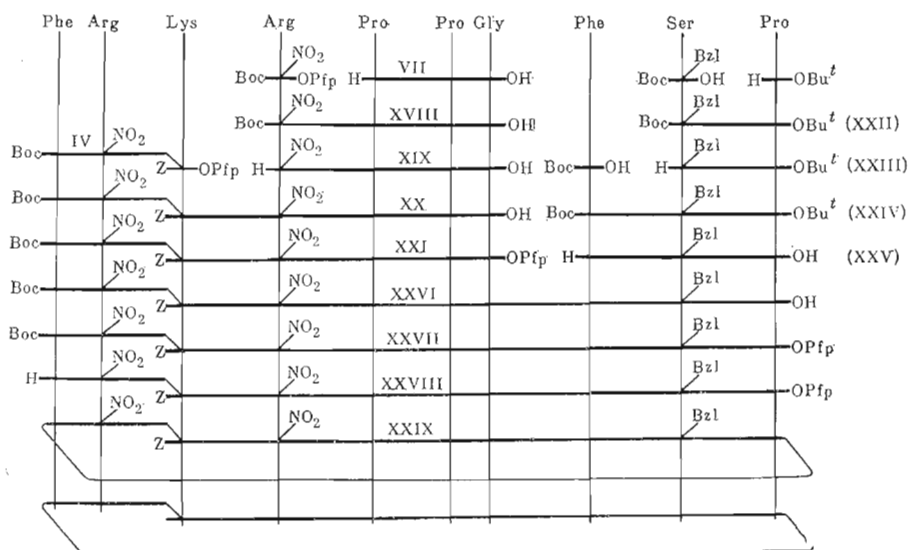
Согласно новому методу, ЦБК получали следующим образом (схема 1). Вос-Arg(NO₂)-ОН, активированный при помощи реагента Вудварда К, ввели во взаимодействие с производным лизина с образованием соединения (I), которое отделили от побочных продуктов препаративной хроматографией на силикагеле. Затем деблокированием с помощью трифторуксусной кислоты получен пептид (II) в виде трифторацетата. В результате реакции последнего с Вос-Phe-OPfp [13] получили трипептид (III), обработкой «комплексом F» [14] превращенный в активированный эфир (IV).

При синтезе фрагмента (VII) реакция Z-Pro-OPfp (синтезированного без выделения) с пролином позволила получить дипептид (V), превращенный в соответствующий пентафторфениловый эфир (без выделения), который в реакции с глицином дал соединение (VI), впоследствии деблокированное каталитическим гидрированием с образованием свободного трипептида (VII). Сочетание пептидных блоков (IV) и (VII) привело к гексапептиду (VIII), активированному далее превращением в производное (IX).

Следующий фрагмент (XIII) синтезирован аналогично синтезу пептида (VII) с выделением промежуточных веществ (X)—(XII). Далее взаимодействие соединений (IX) и (XIII) позволило получить нонапептид (XIV), который действием «комплекса F» превращен в активированный эфир (XV). Затем последовало отщепление Вос-группы хлористым водородом с образованием эфира (XVI) и циклизация последнего действием диизопропилэтиламина в большом объеме диоксана.

Хроматографическая очистка продукта на силикагеле позволила получить защищенный циклопептид (XVII) с выходом 60%. Защитные группы удаляли безводным HF в присутствии анизола, образовавшийся конечный продукт обработкой ионообменной смолой перевели из фторидной в ацетатную форму, затем очищали капельной противоточной хроматографией [15]. Получили химически однородный продукт, идентичный ранее полученному соединению [8]. Строение его дополнительно доказано масс-спектрометрией с десорбцией поля и двумерной ЯМР-спектроскопией (результаты исследования данного образца описаны в работе [11]), а также тестом на оптическую однородность с применением оксидазы *L*-аминокислот [16]. Подобно ранее синтезированному [8] образцу ЦБК полученный продукт вызывал пролонгированный гипотензивный эффект у крыс и проявил лишь слабую миотропную активность (α 0,37, pD_2 5,70) в экспериментах с подвздошной кишкой крысы.

Схема 2



Для получения ЦК (схема 2) использовали полупродукты синтеза ЦБК — соединения (IV) и (VII). Последний вводили в реакцию с активированным производным аргинина с образованием тетрапептида (XVIII), который деблокировали трифторуксусной кислотой с получением соединения (XIX) в виде трифторацетата. Сочетание пептидов (IV) и (XIX) привело к гептапептиду (XX), превращенному затем в активированный эфир (XXI). Трипептид (XXV) синтезировали, используя тактику максимальной защиты. При этом связь серил — пролил образована действием дициклогексилкарбодимида в присутствии *N*-гидроксисбензотриазола, а фенилаланил — серил — под влиянием реагента Вудварда К. Селективное удаление Вос-группы у соединения (XXII) осуществлено *n*-толуолсульфокислотой, а трипептид (XXIV) деблокирован трифторуксусной кислотой. Затем сочетание пептидных блоков (XXI) и (XXV) привело к декапептиду (XXVI). Последующие стадии выполнялись аналогично завершающей части синтеза ЦБК. Очистка конечного продукта проведена высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографией. Недавно опубликованы результаты изучения строения данного образца ЦК двумерной ЯМР-спектроскопией [17]. ЦК обладал длительным воздействием на артериальное давление крыс и миотропной активностью (α 0,90 \pm 0,09; pD_2 6,39 \pm 0,11) и практически идентичен ранее полученному [9] препарату.

Экспериментальная часть

Для синтеза использованы производные аминокислот (Reanal, Венгрия; «Союзреактив»). Все аминокислоты, кроме глицина, имеют *L*-конфигурацию. Упаривание проводили на вакуумном ротационном испарителе при 30° С. Температуры плавления, которые определяли в открытых капиллярах, приведены без исправления. Индивиду-

дуальность 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), система А — изопропиловый спирт, 4 : 1 (Б), хлороформ — этанол — *n*-бутанол — этилацетат — вода, 10 : 6 : 4 : 3 : 1 (В), пиридин — уксусная кислота — этилацетат — вода, 20 : 6 : 9,25 : 11 (Г), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5, верхняя фаза (Д). Электрофорез осуществляли на бумаге FN-16 (ГДР) в 1 *n*. уксусной кислоте, приведена подвижность относительно гистидина (E_{His}). Вещества обнаруживали в УФ-свете, а также с помощью нингидрина, реагентов Сакагучи или хлора-бензидина.

Строение соединений подтверждалось ¹H-ЯМР-спектроскопией. Спектры получали на приборе Bruker WH-90 (ФРГ), химические сдвиги, форма и интенсивность сигналов соответствовали предполагаемому строению пептидов. Аминокислотный анализ выполнен на анализаторе Biosal BC-200 (ФРГ) после 24-часового гидролиза пептидов в запаянной ампуле при 110° С. Аналитическая ВЭЖХ осуществлена на приборе Du Pont 830 (США), приведены коэффициент емкости k' , а также носитель и состав подвижной фазы. Хроматографическая очистка, если не оговорено иначе, проведена на приборе Jobin Yvon Chromatospac Prep 10 (Франция) с использованием силикагеля Н 60 (Merck, ФРГ). Оптическое вращение определено на поляриметре Perkin — Elmer 141 (Швеция).

Вос-Arg(NO₂)-Z-Lys-OH (I). 2,65 г (8,30 ммоль) *Вос-Arg(NO₂)-OH* и 1,80 г (7,20 ммоль) 2-этил-5-фенил-1,2-оксазолиум-3'-сульфоната суспендировали в 70 мл ацетонитрила, охлаждали до 0° С, добавляли 1,0 мл (7,20 ммоль) триэтиламина и перемешивали 2 ч при этой температуре, затем добавляли 2,0 г (7,20 ммоль) *Z-Lys-OH* [18] и 100 мл диметилсульфоксида. Интенсивно перемешивали, в течение 10 ч добавляли раствор 1,0 мл (7,20 ммоль) триэтиламина в 20 мл диметилсульфоксида. Реакционную смесь фильтровали, фильтрат упаривали (1 мм рт. ст., 50° С). Маслянистый остаток растворяли в 100 мл смеси 10% водного $KHSO_4$ и этилацетата (1 : 1). Водный слой отделяли, а органический слой непосредственно использовали для хроматографической очистки (200 г силикагеля, элюировали системой А, 3 л, затем смесью этой системы с этанолом, 5 : 1, 3 л). Фракцию элюата, содержащую чистый пептид, упаривали, остаток растирали с эфиром. Выход 1,82 г (44%). $[\alpha]_D^{20} -7,5^\circ$ (*c* 1, DMF). R_f 0,03 (А), 0,74 (Б), 0,77 (В), 0,84 (Г), 0,66 (Д).

CF₃COOH · H-Arg(NO₂)-Z-Lys-OH (II). 1,82 г (3,13 ммоль) соединения (I) растворяли в смеси 10 мл CH_2Cl_2 и 10 мл CF_3COOH , выдерживали 30 мин при 20° С, упаривали при 20° С. Остаток растирали с безводным эфиром, фильтровали, осадок выдерживали при 1 мм рт. ст. в присутствии КОН. Выход 1,73 г (93%). $[\alpha]_D^{23} +7,8^\circ$ (*c* 1, DMF). R_f 0,22 (В), 0,81 (Г), 0,44 (Д), 0,53 (Е).

Вос-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-OH (III). К раствору 1,73 г (2,91 ммоль) соединения (II) в 50 мл безводного CH_2Cl_2 добавляли 1,50 г (3,47 ммоль) *Вос-Phe-OPfp* [13] и 1,80 мл (10 ммоль) диизопропилэтиламина. Встряхивали до растворения, затем выдерживали 10 ч при 20° С. Реакционную смесь промывали 10% водным $KHSO_4$, затем водой (по 50 мл). Водные растворы объединяли и дважды экстрагировали этилацетатом (по 40 мл). Реакционную смесь после промывок и этилацетатные экстракты объединяли, высушивали $MgSO_4$. Фильтрат упаривали. Остаток растирали с безводным эфиром. Выход 1,78 г (84%). $[\alpha]_D^{20} -15,1^\circ$ (*c* 1, DMF). R_f 0 (А), 0,75 (Б), 0,83 (В), 0,91 (Г), 0,70 (Д).

Вос-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-OPfp (IV). Раствор 1,78 г (2,44 ммоль) соединения (III) и 2,18 г (2,88 ммоль) комплекса дициклогексилкарбодимида с пентафторфенолом (1 : 3) [14] в 50 мл CH_2Cl_2 выдерживали 10 ч при 0° С, фильтрат упаривали, остаток растирали с безводным эфиром. Выход 2,05 г (98%). $[\alpha]_D^{20} -13,0^\circ$ (*c* 1, DMF). R_f 0,36 (А), 0,83 (Б).

Z-Pro-Pro-OH (V). К раствору 50 г (0,20 моль) *Z-Pro-OH* и 50 г (0,27 моль) пентафторфенола в 500 мл диоксана, охлажденному до 10° С, добавляли раствор 50 г (0,24 моль) дициклогексилкарбодимида в 70 мл диоксана. Выдерживали 2 ч при 10° С, к фильтрату добавляли раствор 30 г (0,26 моль) пролина в 70 мл воды и 69,5 мл (0,50 моль) триэтиламина. Выдерживали 20 ч при 10° С, упаривали, маслообразный остаток растворяли в 500 мл хлороформа. Экстрагировали 5% водным $NaHCO_3$ (3 × 500 мл), объединенную водную фазу подкисляли конц. HCl до pH 2, выдерживали при 0° С. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали 10% этанолом (500 мл), высушивали. Выход 61,4 г (89%). Т. пл. 188—189° С (лит. 191,5—193,5° С [19]). $[\alpha]_D^{20} -79,3^\circ$ (*c* 1, DMF) ($-82,5^\circ$ [19]). R_f 0,32 (А), 0,86 (Б), 0,84 (В), 0,71 (Д).

Z-Pro-Pro-Gly-OH (VI). К раствору 70 г (0,20 моль) соединения (V) и 50 г (0,27 моль) пентафторфенола в 700 мл хлороформа, охлажденному до 10° С, добавляли 50 г (0,24 моль) дициклогексилкарбодимида и встряхивали до растворения. Выдерживали 2 ч при 10° С, фильтрат упаривали. Маслообразный остаток растворяли в 800 мл диоксана, добавляли раствор 18,8 г (0,25 моль) глицина в 200 мл воды и *N*-метилморфолин до pH 8 (по индикаторной бумажке). Выдерживали 20 ч при 20° С, упаривали, маслянистый остаток растворяли в смеси хлороформа и 5% $NaHCO_3$ (по 1 л). Образовавшийся осадок отфильтровывали, отделяли водный слой, органический слой экстрагировали 5% $NaHCO_3$ (1 л). Объединенную водную фазу нейтрализовали из-

бытком конц. HCl (до pH 2). Выпало масло. Водный раствор сливали и экстрагировали хлороформом (3 × 500 мл). Органические вытяжки объединяли с маслом, упаривали, остаток растирали со смесью безводный эфир — гексан (1 : 1). Выход 70,2 г (87%). Т. пл. 109—111° С. $[\alpha]_D^{20}$ —75,5° (с 2, DMF) (—75,2° [20]). R_f 0,14 (А), 0,72 (Б), 0,69 (В), 0,83 (Г), 0,58 (Д).

II-Pro-Pro-Gly-OH (VII). 4,0 г (10 ммоль) соединения (VI) суспендировали в 100 мл воды и гидрировали 4 ч в присутствии Pd-черни. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Маслянистый остаток непосредственно использовали для последующего синтеза. R_f 0 (В), 0,37 (Г), 0,09 (Д).

Boc-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Pro-Pro-Gly-OH (VIII). К раствору 5,5 г (6,1 ммоль) соединения (IV) и ~10 ммоль соединения (VII) в смеси диоксан — вода (3 : 1; 150 мл) добавляли диизопропиламиды до pH 8, выдерживали 48 ч при 0° С. Упаривали, остаток растворяли в смеси CH₂Cl₂ и 10% KHSO₄ (по 200 мл). Органический слой отделяли, промывали 200 мл воды, упаривали. Остаток растирали с безводным эфиром. Очищали хроматографически (200 г силикагеля, элюент — система А — изопропанол, 30 : 1; 3 л). Фракцию, содержащую чистый пептид (VIII), упаривали, остаток растирали с безводным эфиром. Выход 3,8 г (64%). $[\alpha]_D^{20}$ —52,5° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,50 (Б), 0,50 (В), 0,87 (Г), 0,53 (Д).

Boc-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Pro-Pro-Gly-OPfp (IX). Синтезировали из соединения (VIII) аналогично получению соединения (IV). Выход 96%. R_f 0,84 (Б), 0,62 (В).

Z-Phe-Gly-OH (X). К раствору 4,7 г (10 ммоль) Z-Phe-OPfp [14] в 75 мл диоксана добавляли раствор 1,5 г (20 ммоль) глицина и 2,5 г (30 ммоль) NaHCO₃ в 25 мл воды. Выдерживали 20 ч при 20° С, упаривали. Остаток растворяли в 50 мл воды, экстрагировали 50 мл эфира, водную фазу нейтрализовали 10% KHSO₄ до pH 2. Образовавшийся кристаллический осадок отфильтровывали и промывали водой. Выход 2,8 г (79%). Т. пл. 151° С (143—145° С [21]). $[\alpha]_D^{20}$ —23,4° (с 1, DMF) (—23,3° [13]). R_f 0,15 (А), 0,71 (Б), 0,85 (В), 0,86 (Д).

Z-Phe-Gly-OPfp (XI). К раствору 10,8 г (30 ммоль) соединения (X) и 7,5 г (40 ммоль) пентафторфенола в 300 мл диоксана после охлаждения до 10° С добавляли 7,5 г (36 ммоль) дициклогексилкарбодимиды и встряхивали до растворения. Выдерживали 3 ч при 20° С, фильтрат упаривали до начала кристаллизации, осаждали 700 мл безводного эфира. Выход 13,8 г (87%). Т. пл. 166° С. $[\alpha]_D^{20}$ —19,1° (с 1, DMF). R_f 0,75 (А), 0,96 (Б).

Z-Phe-Gly-Pro-OH (XII). К раствору 30 г (57 ммоль) соединения (XI) в 120 мл диметилформамида добавляли раствор 12 г (104 ммоль) пролина и 12 мл (108 ммоль) N-метилморфолина в 30 мл воды. Выдерживали 20 ч при 20° С, добавляли конц. HCl до pH 2 (по индикаторной бумажке). Смесь выливали в 1,5 л воды, выдерживали при 0° С. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали водой, высушивали, затем обрабатывали 300 мл эфира. Выход 19,6 г (76%). Т. пл. 208° С. $[\alpha]_D^{20}$ —56,2° (с 1, DMF). R_f 0,54 (А), 0,97 (Б), 0,95 (В), 0,84 (Д).

H-Phe-Gly-Pro-OH (XIII). 4,54 г (10 ммоль) соединения (XII) суспендировали в 200 мл CH₃COOH и гидрировали 3 ч в присутствии Pd-черни. После отделения катализатора фильтрат упаривали, маслянистый остаток обрабатывали безводным эфиром. Выход 3,2 г (количественный). Т. пл. 206° С. R_f 0 (Б), 0 (В), 0,76 (Г), 0,25 (Д).

Boc-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-OH (XIV). К раствору 3,63 г (3,17 ммоль) соединения (IX) в 50 мл CH₂Cl₂ добавляли 1,24 г (3,87 ммоль) соединения (XIII) и 1,2 мл (7,0 ммоль) диизопропилэтиламина. Перемешивали 20 ч при 20° С, промывали 5% KHSO₄ (2 × 50 мл) и 50 мл воды. Сушили MgSO₄, фильтрат упаривали, остаток растирали с безводным эфиром. Выход 3,4 (82%). $[\alpha]_D^{20}$ —52,9° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,23 (Б), 0,26 (В), 0,78 (Г), 0,49 (Д).

Boc-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-OPfp (XV) синтезировали из соединения (XIV) аналогично получению соединения (IV). Выход 97%. R_f 0,04 (А), 0,52 (Б), 0,70 (В).

HCl·H-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-OPfp (XVI). К раствору 3,72 г (2,57 ммоль) соединения (XV) в 40 мл CH₂Cl₂ добавляли 5 мл насыщенного раствора безводного HCl в диоксане, выдерживали 30 мин при 20° С. Затем упаривали, остаток растирали с 50 мл безводного эфира. Образовавшийся осадок выдерживали при 1 мм рт.ст. в присутствии KOH. Выход 3,35 г (94%). R_f 0,03 (Б), 0,04 (В).

Z-Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-OPfp (XVII). К раствору 3,35 г (2,42 ммоль) соединения (XVI) в 3,5 л диоксана, свежеперегнанного над Na, добавляли 1,24 мл (6,92 ммоль) диизопропилэтиламина и выдерживали 24 ч при 20° С. Упаривали, остаток растирали с 50 мл эфира. Образовавшийся осадок перемешивали с 20 мл воды, высушивали, затем растворяли в 50 мл CHCl₃ и очищали хроматографически (200 г силикагеля, элюция системой А). Фракцию элюата, содержащую чистый циклопептид, упаривали, остаток кристаллизовали растиранием с 50 мл безводного эфира. Выход 1,68 г (59,5%). $[\alpha]_D^{20}$ —44,1° (с 1, DMF). R_f 0 (А), 0,11 (Б), 0,42 (В), 0,45 (Д). k' 7,0 (Zorbax C₁₈, CH₃CN — H₂O, 4 : 6).

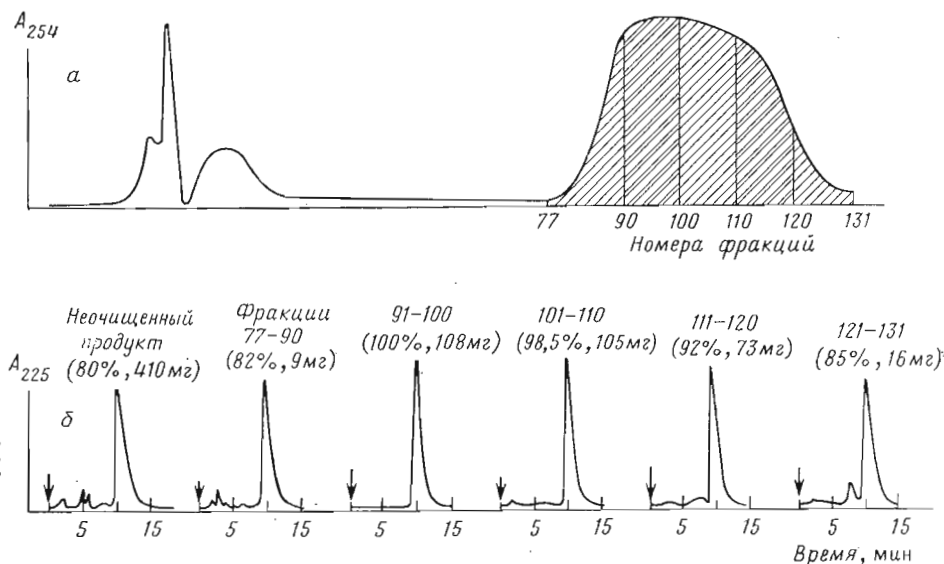


Рис. 1. Очистка ЦБК (0,41 г) капельной противоточной хроматографией. *a* — прибор DCC-A (Токуо Rikakikai, Япония), 175 трубочек, хроматографическая система Д, подвижная фаза — верхняя, производительность 4 мл/ч, собирали одну фракцию в 1 ч. Указаны границы объединения фракций. *б* — аналитические хроматограммы (чистота, масса) полученных продуктов. Колонка 0,46 × 25 см, Zorbax C₁₈, элюент — CH₃CN — 0,2 М CH₃COONH₄ (4 : 6), поток 2 мл/мин

N-Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-Arg-¹-2CH₃COOH (ЦБК). В прибор для работы с безводным HF (Protein Research Foundation, Япония) помещали 1,56 г (1,34 ммоль) соединения (XVII) и 3 мл анизол, затем туда же конденсировали 25 мл HF, перемешивали до растворения и выдерживали 1 ч при 20° С. Упаривали при помощи тefлонового водоструйного насоса, остаток выдерживали 10 ч в эксикаторе при 20 мм рт.ст. в присутствии KOH (300 г) и H₂SO₄ (500 г). Образовавшийся твердый продукт растворяли в 20 мл воды, раствор фильтровали. Фильтрат обрабатывали 1 ч 10 г амберлита IR-4B (Serva, ФРГ) в ацетатной форме. (Коммерческую или использованную смолу помещали в аппарат Сокслета и кипятили 12 ч со смесью этанол — 25% водный аммиак (1 : 1). Затем промывали водой до нейтральной реакции, обрабатывали 10% CH₃COOH, снова промывали водой.) Фильтровали, смолу на фильтре промывали 100 мл воды, объединенный фильтрат лиофилизовали. Масса продукта 1,40 г, чистота по ВЭЖХ ~80%, реакция на фторид-ион [22] отрицательна. 0,41 г этого вещества растворяли в 5 мл хроматографической системы Д и очищали на капельном противоточном хроматографе (рис. 1). Объединенные фракции упаривали, остаток растворяли в 50 мл воды, осадок отделяли, фильтрат лиофилизовали. Выход вещества, полученного из фракций 91—110, — 213 мг (49%). $[\alpha]_D^{20}$ — 63,3° (с 1, вода). *R_f* 0 (B), 0,84 (Г), 0,23 (Д), 0,65 (E). *k'* 2,62 (Zorbax C₁₈, CH₃CN — 1% Bu₄ⁿNH₂PO₄, 1 : 4); 5,76 (Zorbax C₁₈, CH₃CN — 0,2 М CH₃COONH₄, 4 : 6). Данные масс-спектрометрии с десорбцией поля *m/z*: (*M* + Na)⁺ 1006, (*M* + K)⁺ 1022. ¹H-ЯМР-спектр описан в работе [11]. Аминокислотный анализ: Lys 1,16 (1), Pro 2,74 (3), Gly 2,00 (2), Phe 1,90 (2), Arg 0,91 (1). Окисление гидролизата в присутствии оксидазы *L*-аминокислот из яда гремучей змеи [16] показало отсутствие *D*-изомеров Lys, Phe, Arg.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH (XVIII). Масло, содержащее ~5,8 ммоль соединения (VII), растворяли в 50 мл DMF, охлаждали до 0° С, добавляли 4,85 г (10 ммоль) *Boc*-Arg(NO₂)-OPfp [14] и 2,17 мл (16 ммоль) динизопропиламина. Выдерживали 20 ч при 0° С, упаривали, остаток растворяли в 100 мл CHCl₃, экстрагировали 10% KHSO₄ (2 × 100 мл) и 100 мл воды. Органический слой использовали для хроматографического разделения (200 г силикагеля, элюция смесью система А — CHCl₃ (1 : 1, 2 л), системой А (2 л), смесью система А — изопропанол (4 : 1, 2,5 л). Фракцию элюата, содержащую чистый пептид, упаривали, остаток растирали с эфиром. Получили 1,86 г (56%) аморфного вещества. *R_f* 0,08 (B), 0,45 (Д).

CF₃COOH-*H*-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH (XIX) синтезировали из соединения (XVIII) аналогично получению соединения (II). Выход 97%. $[\alpha]_D^{20}$ — 67,6° (с 0,54, этанол). *R_f* 0 (B), 0,52 (Г), 0,12 (Д), 0,57 (E). *k'* 3,64 (Zorbax C₁₈, CH₃CN — 0,2 М CH₃COONH₄, 1 : 99).

Boc-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OH (XX). К раствору 2,05 г (2,39 ммоль) соединения (IV) и 1,40 г (2,39 ммоль) соединения (XIX) в 50 мл безводного CH₂Cl₂ добавляли 1,23 мл (6,9 ммоль) динизопропиламина. Перемешивали 12 ч, встряхивали с 50 мл 10% водного KHSO₄, фильтровали, органический слой фильтрата отделяли, промывали 50 мл воды, упаривали. Остаток растирали

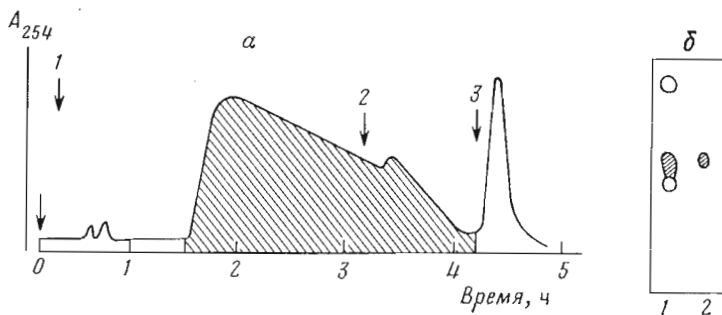


Рис. 2. Очистка соединения (XXIX). а — 10,2 г исходной смеси, 200 г силикагеля, элюция системой растворителей А (1), смесью системы А и изопропанола, 10 : 1 (2) и смесью хлороформ — этанол — вода, 40 : 47 : 5 (3); скорость элюции 1 л/ч. Заштрихована выделяемая фракция (4,65 г чистого продукта). б — тонкослойная хроматограмма исходной смеси (1) и очищенного продукта (2) (система Б)

с эфиром. Выход 2,72 г (96%). $[\alpha]_D^{20}$ —63,9° (с 1, этанол). R_f 0 (А), 0,11 (Б), 0,26 (В), 0,83 (Г), 0,45 (Д).

Voc-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-OPfp (XXI) синтезировали из соединения (XX) аналогично получению соединения (IV). Выход 98%. R_f 0 (А), 0,32 (Б).

Voc-Ser(Bzl)-Pro-OBu^t (XXII). В делительную воронку помещали 1,91 г (4,0 ммоль) *Voc-Ser(Bzl)-OH·DCHA*, 50 мл этилацетата и 30 мл 10% KHSO_4 . Встряхивали до растворения, водный слой отделяли, а органический встряхивали с 30 мл воды, затем сушили MgSO_4 , фильтровали, к фильтрату добавляли 0,54 г (4,0 ммоль) *N*-гидроксибензотриазола и 20 мл тетрагидрофурана. Перемешивали до растворения, охлаждали до 0° С, добавляли 0,82 г (4,0 ммоль) дициклогексилкарбодимид. Перемешивали 1 ч при 0° С, затем 40 мин при 20° С, добавляли 0,83 г (4,0 ммоль) $\text{HCl} \cdot \text{H-Pro-OBu}^t$ и 0,68 мл (4,0 ммоль) диизопропилэтиламина. Выдерживали 20 ч при 20° С, фильтрат упаривали, к остатку добавляли 50 мл гексана и 30 мл 10% KHSO_4 . Фильтровали, органический слой отделяли, встряхивали с 20 мл воды, упаривали. Выход бесцветного масла 1,65 г (92%). $[\alpha]_D^{20}$ —13,7° (с 1, этанол). R_f 0,87 (А), 0,92 (Б), 0,95 (В), 0,87 (Д).

TosOH·H-Ser(Bzl)-Pro-OBu^t (XXIII). К раствору 1,65 г (3,68 ммоль) соединения (XXII) в 20 мл ледяной CH_3COOH при 20° С по каплям добавляли раствор 0,70 г (4,0 ммоль) $\text{TosOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ в 10 мл ледяной CH_3COOH . Выдерживали 1 ч при 20° С, упаривали при 20° С, остаток растирали со смесью 20 мл безводного эфира и 50 мл гексана. Фильтровали, осадок высушивали при 1 мм рт.ст. Выход 1,61 г (84%). $[\alpha]_D^{20}$ —38,5° (с 1, этанол). R_f 0 (А), 0,42 (Б), 0,62 (В), 0,72 (Г), 0,44 (Д), 0,72 (Е).

Voc-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OBu^t (XXIV). К 1,04 г (3,48 ммоль) *Voc-Phe-OH* в 50 мл CH_3CN добавляли 0,88 г (3,48 ммоль) 2-этил-5-фенил-1,2-оксазолон-3'-сульфоната, охлаждали до 0° С и добавляли 0,48 мл (3,48 ммоль) триэтиламина. Перемешивали 2 ч при 0° С, затем добавляли 1,61 г (3,48 ммоль) соединения (XXIII) и 0,48 мл (3,48 ммоль) триэтиламина. Выдерживали 24 ч при 20° С. Упаривали, остаток растворяли в смеси 30 мл воды и 30 мл этилацетата. Водный слой экстрагировали 30 мл этилацетата, объединенные органические вытяжки промывали 5% KHSO_3 , затем 10% KHSO_4 (по 10 мл). Сушили MgSO_4 , фильтровали, упаривали. Выход желтоватого масла 1,66 г (80%). $[\alpha]_D^{20}$ —65,3° (с 1, этанол). R_f 0,57 (А), 0,96 (Б), 0,93 (В), 0,92 (Г), 0,72 (Д).

CF₃COOH·H-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OH (XXV) синтезировали из соединения (XXIV) аналогично получению соединения (IV), выдерживали 2 ч. Выход 85%. $[\alpha]_D^{20}$ —17,5° (с 1, этанол). R_f 0 (А), 0,30 (Б), 0,57 (В), 0,81 (Г), 0,71 (Д), 0,55 (Е).

Voc-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OH (XXVI) синтезировали из соединения (XXI) аналогично получению соединения (XX). Выход 87%. $[\alpha]_D^{20}$ —44,0° (с 1, этанол). R_f 0,12 (Б), 0,43 (В), 0,92 (Г), 0,55 (Д).

Voc-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OPfp·CF₃COOH (XXVII) синтезировали из соединения (XXVI) аналогично получению соединения (IV). Выход 97%. R_f 0,37 (Б), 0,63 (Д).

CF₃COOH·H-Phe-Arg(NO₂)-Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-OPfp (XXVIII) синтезировали из соединения (XXVII) аналогично получению соединения (IV). Выход 94%. R_f 0,03 (Б), 0,07 (В), 0,23 (Д).

Z-Lys-Arg(NO₂)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser(Bzl)-Pro-Phe-Arg(NO₂) (XXIX) синтезировали из соединения (XXVIII) аналогично получению соединения (XVII), очищали хроматографически (рис. 2). Выход 56%. $[\alpha]_D^{20}$ —71,2° (с 1, метанол). R_f 0,16 (Б), 0,48 (В), 0,91 (Г), 0,40 (Д). k' 3,55 (*Zorbax* C₁₈, CH_3CN — 0,1 М $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2, 45 : 55).

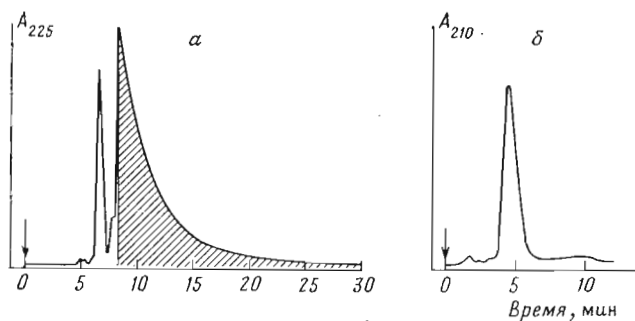


Рис. 3. а — очистка ЦК (100 мг) препаративной ВЭЖХ, колонка $2,12 \times 25$ см, носитель Zorbax C_8 , элюент — этанол — $0,1$ М CH_3COONH_4 (3 : 7). Отмечена выделяемая фракция. б — аналитическая хроматограмма продукта очистки. Колонка $0,46 \times 25$ см, носитель Zorbax C_{18} , элюент — CH_3CN — 1% н. $Bu_4NH_2PO_4$ (1 : 9)

N-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg- $\cdot 3CH_3COOH$ (ЦК) синтезировали из соединения (XXIX) аналогично получению ЦБК. 100 мг сырого продукта очищали на высокоэффективной колонке ($2,12 \times 25$ см) с носителем Zorbax C_8 (рис. 3). Фракцию, содержащую продукт, упаривали, лиофилизовали. Выход 56,6 мг (42%). Данные масс-спектрометрии с десорбцией поля, m/z : ($M + H$)⁺ 1170, ($M + H - H_2O$)⁺ 1152. ¹H-ЯМР-спектр описан в работе [17]. Аминокислотный анализ: Lys 1,06 (1), Arg 2,06 (2), Pro 3,20 (3), Gly 1,00 (1), Phe 1,86 (2), Ser 0,88 (1). Окисление гидролизата в присутствии оксидазы *L*-аминокислот из яда гремучей змеи [16] показало отсутствие *D*-изомеров Lys, Arg, Phe. $[\alpha]_D^{20} -60,5^\circ$ (c 1, вода). R_f 0,85 (E), 0,71 (Г), 0,13 (Д), 0,85 (E). k' 2,05 (Zorbax C_{18} , CH_3CN — 1% $Bu_4NH_2PO_4$, 1 : 9); 9,21 (Zorbax C_{18} , CH_3CN — $0,1$ М CH_3COONH_4 , 4 : 6).

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В. Т., Филатова М. П., Рейссманн З., Реутова Т. О., Чехляева Н. М. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 9. С. 1157—1168.
2. Ефремов Е. С., Филатова М. П., Реутова Т. О., Степанова Л. Н., Рейссманн З., Иванов В. Т. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 9. С. 1169—1180.
3. Филатова М. П., Рейссманн З., Реутова Т. О., Иванов В. Т., Григорян Г. Л., Шапиро А. М., Розанцев Э. Т. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 9. С. 1181—1189.
4. Галактионов С. Г., Шерман С. А., Шендерович М. Д., Никифорович Г. В., Леонова В. И. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 9. С. 1190—1197.
5. Ivanov V. T., Filatova M. P., Reißmann S., Reutova T. O., Kogan G. A., Efremov E. S., Pashkov V. S., Galaktionov S. G., Grigoryan G. L., Ovchinnikov Yu. A. // Peptides. Chemistry. Structure and Biol., Proc. 4-th Amer. Pept. Symp., Ann Arbor Sci., Ann Arbor, 1975. P. 151—157.
6. Саулитис Ю. Б., Лиепиньш Э. Э., Секацис И. П., Мутулис Ф. К., Мутуле И. Э., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 437—447.
7. Chipens G. I., Mutulis F., Galaktionov S. // Frontiers of bioorganic chemistry and molecular biology / Ed. Ananchenko S. N. N. Y.: Pergamon Press, 1980. P. 99—103.
8. Chipens G., Mutulis F., Katayev B., Klusha V., Misina I., Myshlyakova N. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1981. V. 18. № 2. P. 302—311.
9. Mutulis F. K., Chipens G. I., Lando O. E., Mutule I. E. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1984. V. 23. № 3. P. 235—241.
10. Mutulis F. K., Chipens G. I., Mutule I. E., Maurops G. H. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1985. V. 26. № 5. P. 449—459.
11. Саулитис Ю. Б., Лиепиньш Э. Э., Секацис И. П., Шендерович М. Д., Мутулис Ф. К., Мутуле И. Э., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1013—1025.
12. Chipens G. I., Mutulis F. K., Myshlyakova N. V., Misina I. P., Vitolina R. O., Klusha V. J., Katayev B. S. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1985. V. 26. № 5. P. 460—468.
13. Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I. // Ann. 1973. № 9. P. 1421—1429.
14. Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M. // J. Amer. Chem. Soc. 1967. V. 89. № 1. P. 183—184.
15. Tanimura T., Pisano J. J., Ito Y., Bowman R. L. // Science. 1970. V. 169. № 3940. P. 54—56.
16. van Zon A., Beyerman H. C. // Helv. chim. acta. 1973. V. 56. № 5. P. 1729—1740.
17. Саулитис Ю. Б., Лиепиньш Э. Э., Мутулис Ф. К., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 10. С. 1317—1328.
18. Scott J. W., Parker D., Parrish D. K. // Synth. Commun. 1981. V. 11. № 4. P. 303—314.
19. Bruckner P., Rutschmann B., Engel J., Rothe M. // Helv. chim. acta. 1975. V. 58. № 5. P. 1276—1287.

20. *Guttmann St., Pless J., Boissonnas R. A.* // *Helv. chim. acta.* 1962. V. 45. № 1. P. 170—177.
21. *Immer H., Nelson V. R., Reverz C., Sestanj K., Götz M.* // *J. Med. Chem.* 1974. V. 17. № 10. P. 1060—1065.
22. Хроматография в тонких слоях/Ред. Шталь Э. М. М.: Мир, 1965. С. 492.

Поступила в редакцию
27.V.1987

AN EFFICIENT SYNTHESIS OF BRADYKININ CYCLOANALOGUES

MUTULE I., MUTULIS F., ERGLIS D.*, JAKSTINA D.*,
SEKACIS I., ROZITE S., GRIGORIEVA V., MISINA I.,
CHIPENS G.

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

Cyclo- ϵ -(L-lysine¹,glycine⁶-bradykinin) (CLGB) and cyclo- ϵ -kallidin have been synthesised in solution. To prepare linear precursors, fragment condensation (3 + 3 or 4) + 3 was used. Peptide bond formation, including cyclization, was carried out mainly through intermediate pentafluorophenyl esters. After purification on silicagel, protected cyclopeptides were obtained with a 50 to 60% yield. The protecting groups were eliminated by treatment with hydrogen fluoride in the presence of anisole. CLGB and CK were purified by droplet countercurrent chromatography and by reversed-phase HPLC, respectively.