



УДК 577.175.829.17 : 547.964.4. 415.1.057

© 1991 г.

**Ф. К. Мутулис, И. Э. Мутуле, Г. Х. Мауронс,
Ю. Бергманн*, Н. В. Мышлякова, Г. М. Стразда,
Э. Э. Лиепиньш, Ю. В. Саулитис, В. Д. Григорьева,
Ю. Ю. Балодис, В. И. Цетлин**, Е. М. Лазарович****

ЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ВЕЩЕСТВА Р

III*. Cyclo[6^v → ОЛИГОМЕТИЛЕНДИАМИН ← 11]ВЕЩЕСТВО- Р(6—11)-ГЕКСАПЕПТИДЫ

Институт органического синтеза АН Латвии, Рига;

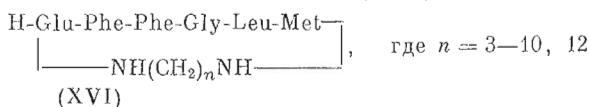
** Центральный институт молекулярной биологии АН ГДР, Берлин;*

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

Получены циклические аналоги вещества Р формулы $\text{cyclo}[\text{Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH}(\text{CH}_2)_n\text{NH-}]$, где $n = 3-10, 12$, и линейные аналоги: $\text{H-Glu(NHR)-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NHR}$, где $\text{R} = -\text{CH}_3, -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$. Конформационный анализ циклопептидов проведен с помощью ЯМР. Соединения с $n = 3-8$ обнаруживают присутствие упорядоченных структур. Циклопептид с $n = 5$ имеет вытянутый участок Glu-Phe-Phe, β -изгиб типа II и две внутримолекулярные водородные связи. Циклоаналоги обладают лишь слабой способностью вызывать сокращение подвздошной кишки морской свинки, некоторых из них в этом тесте являются антагонистами вещества Р. Линейные аналоги проявили относительно высокую миотронную активность.

С целью интенсификации исследований, направленных на закрепление «биологически активных» конформаций пептидных биорегуляторов, в данной работе предложен новый подход для получения их циклических аналогов. Суть его заключается в следующем. Пептид — линейный предшественник должен содержать две одинаковые функциональные группы, которые могут вступать во взаимодействие с бифункциональным низкомолекулярным соединением с образованием двух ковалентных связей и замыканием цикла. Используя различные низкомолекулярные соединения, из одного линейного предшественника можно синтезировать ряд циклопептидов.

В настоящем исследовании мы использовали этот подход для получения новых циклических производных С-концевого участка вещества Р. Конформационные расчеты предполагают существование на этом участке структур со сближенными амидными группами боковой цепи Gln^6 и С-конца [3]. Поэтому нам представлялось целесообразным попытаться «закрепить» такую структуру, соединив эти группы цепочкой метиленовых групп с образованием соединений типа (XVI):

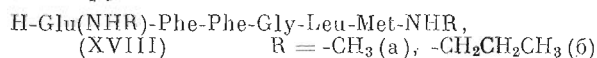


* Предыдущие сообщения этой серии см. [1, 2].

Сокращения: α — «внутренняя активность», характеризует способность вещества вызывать биологический эффект; ED_{30} — концентрация пептида, вызывающая 30% от максимального эффекта вещества Р; ID_{50} — концентрация антагониста, которая уменьшает субмаксимальный эффект вещества Р на 50%; IC_{50} — концентрация пептида, необходимая для вытеснения половины радиоактивного производного вещества Р из его комплекса с рецептором; k' — коэффициент емкости при ВЭЖХ; pD_2 — показатель специфического сродства, характеризующий способность пептида связываться с рецептором; Adp — 2-(1-адамантил)-2-пропил; Adpos — 2-(1-адамантил)-2-пропил-оксикарбонил; Pfp — пентафторфенил; Nb — n -нитробензил; Z — бензилоксикарбонил.

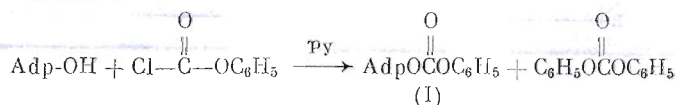
Первичная структура таких молекул минимально отличается от таковой вещества -P-(6—11)-гексапептида. Это отличие заключается лишь в замене первичных амидных групп природного пептида на вторичные и присоединении цепочки метиленовых групп.

Для оценки влияния циклизации на свойства природного гексапептида было синтезировано два линейных гексапептида (XVIIIa, б), содержащих вторичные амидные группы:

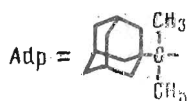
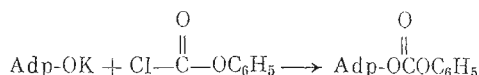


В литературе [4] описано получение вещества, подобного соединениям типа (XVI) — cyclo(Glp-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH(CH₂)₂NH-), однако какие-либо сведения о последующем изучении этого циклопептида отсутствуют.

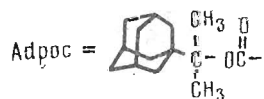
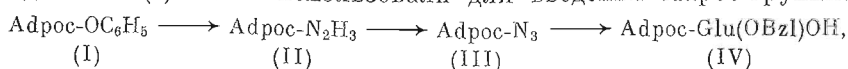
При синтезе соединений типа (XVI) возникли большие трудности, которые удалось преодолеть, применив особо кислотолабильную 2-(1-адамантил)изопропилоксикарбонильную (Adpoc) группу [5]. Получение Adpoc-Glu(OBzl)-OH, использованного в синтезе циклопептидов, также оказалось непростым делом. Нам не удалось воспроизвести описанное в литературе [5] получение соединения (I), поскольку главным продуктом реакции оказался дифенилкарбонат:



С хорошим выходом (52%) эфир (I) удалось получить, используя 2-(1-адамантил)изопропилат калия:

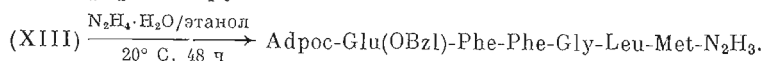


Соединение (I) затем использовали для введения Adpoc-группы:



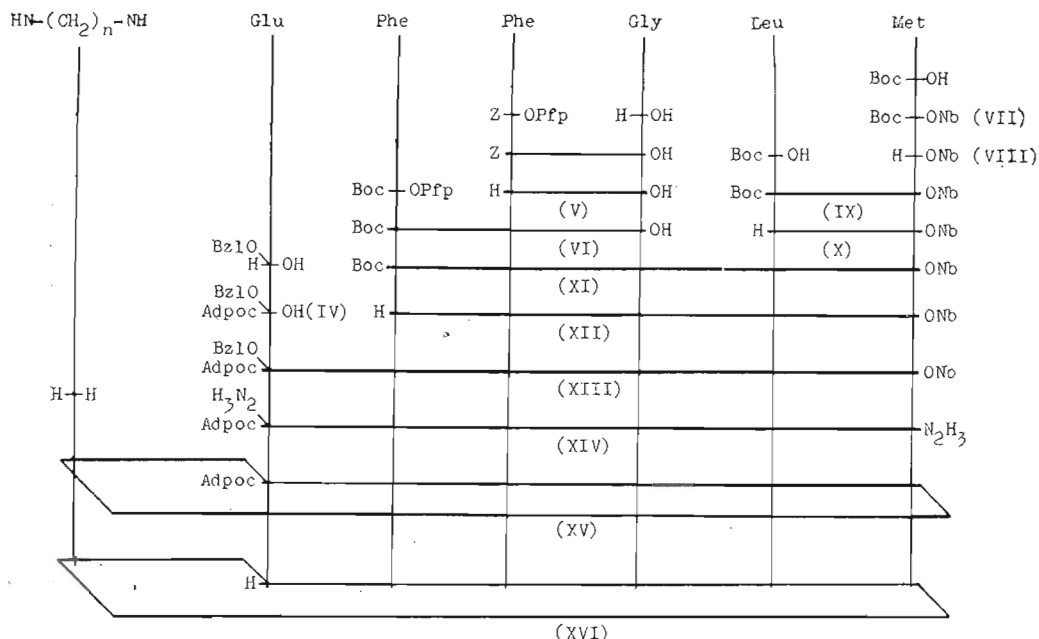
Дальнейший синтез циклопептидов типа (XVI) проводили согласно схеме на с. 1414.

Дипептид (V) получили каталитическим гидрированием Z-Phe-Gly-OH [6]. Другой дипептид (IX) синтезировали карбодиимидным методом. Фрагменты (VI) и (X) конденсировали с помощью дициклогексилкарбодиимида в присутствии HOPf. Гексапептид (XIII) синтезирован с промежуточным образованием пентафторфенилового эфира. Последующая обработка гидразин-гидратом в диметилформамиде привела к дигидразиду (XIV). При проведении этой реакции в этаноле отмечен селективный обмен C-концевой эфирной группы:



Гидразид (XIV) затем ввели в азидный синтез по Рудингеру. Образовавшийся диазид без выделения обрабатывали диаминами типа H₂N(CH₂)_n·NH₂, используя 9 диаминов с n = 3—10, 12, что позволило получить 9 циклопептидов типа (XV) (табл. 1). (Попытки сочетания диазида также

Синтез соединений типа (XVI)



с этилендиаминном, гидразином или 1,3-диаминопропанолом-2 не привели к получению ожидаемых циклопептидов из-за побочных процессов.) Последующее удаление Адрос-группы (3% HCl в CH₂Cl₂, -8° С, 5 мин) привело к целевым пептидам типа (XVI) (табл. 2).

Соединения (XVIIIa, б) получали исходя из гидразида (XIV) аналогично синтезу циклопептидов типа (XVI), вместо диаминов использовали метиламин или *n*-пропиламин.

Полученные целевые продукты позволили проследить, как однотипные изменения в структуре соединений типа (XVI), обусловленные изменением числа метиленовых групп, отражаются на их свойствах. Сравнение физических констант этих веществ (табл. 2) обнаруживает большие расхождения в величинах температур плавления и оптического вращения, что свидетельствует о существенном различии их молекулярного строения. С увеличением числа метиленовых групп наблюдается в общем закономерное увеличение времен удерживания на колонках с обращенной фазой (рис. 1).

Конформационный анализ циклопептидов проведен с помощью 2D-методов как гомо-, так и гетеро-ЯМР в растворе (CD₃)₂SO [7—9]. Установлено, что для соединения (XVI₃) характерно наличие двух основных конформеров. Первый из них имеет β-изгиб типа II во фрагменте Phe-Gly-Leu-Met, а второй — β-изгиб типа II на участке Gly-Leu-Met-NH. Для N-концевой части молекулы циклопептида (XVI₃) можно предположить вытянутую, малоподвижную конформацию.

С-Концевая часть пептида (XVI₄) может находиться в различных конформационных состояниях. Тут возможен γ-изгиб в последовательности Leu-Met-NH, β-изгиб типа I в последовательности Gly-Leu-Met-NH и β-изгиб типа II во фрагменте Phe-Gly-Leu-Met, аналогичный β-изгибу в одной из конформаций циклопептида (XVI₃). N-Концевая часть молекулы вытянута и стабилизирована водородной связью Glu C=O...NH Phe.

Циклопептид (XVI₅) имеет наиболее однородную пространственную структуру (рис. 2). N-Концевая часть молекулы вытянута и стабилизирована такой же водородной связью, как в соединении (XVI₄). Вторая водородная связь в С-концевой части стабилизирует β-изгиб типа II. Циклопептид (XVI₇) в N-концевой части имеет вытянутый, малоподвижный участок, содержащий водородную связь аналогично соединениям (XVI₄) и (XVI₅), а С-концевой участок подвижен и может принимать различные конформации. Тут возможен γ-изгиб во фрагменте Gly-Leu-Met с водо-

Выход и свойства соединений типа (XV)

Соедине- ние (XV _n), n	Выход, %	Т. пл., °C	[α] _D ²⁰ , град (с 1, метанол)	R _f в системах		
				Б	В	Г
3	34	222—228 разл.	—52,5	0,11	0,11	0,69
4	30	199—201 »	—52,5	0,13	0,16	0,73
5	28	221—223 »	—46,0	0,14	0,18	0,75
6	23	198—199 »	—45,2	0,15	0,19	0,75
7	21	194—195 »	—37,5	0,16	0,16	0,71
8	19	114—116 »	—33,6	0,17	0,20	0,78
9	18	114—115 »	—28,2	0,17	0,26	0,80
10	11	211—213 »	—28,0	0,18	0,30	0,81
12	12	204—206 »	—27,3	0,19	0,33	0,82

Таблица 2

Выход и свойства соединений типа (XVI)

Соедине- ние (XVI _n), n	Выход, %	Т. пл., °C	[α] _D ²⁰ , град (с 1, метанол)	κ'	E _{His}	R _f в системах	
						Е	IK
3	84	233 разл.	—56,0	2,9	0,51	0,36	0,46
4	93	224—230 разл.	—22,5	2,9	0,51	0,37	0,44
5	95	240—241 разл.	—22,7	3,6	0,51	0,38	0,49
6	97	235—236 »	—8,9	4,2	0,51	0,38	0,54
7	89	219—220 »	—14,0	5,6	0,48	0,39	0,58
8	98	224—226 »	—6,2	7,4	0,48	0,39	0,63
9	82	157—160 разл.	—3,0	11,2	0,48	0,40	0,68
10	92	227—228 »	—8,7	14,9	0,47	0,40	0,72
12	91	235—236 »	—10,0	42,3	0,47	0,41	0,81

родной связью Gly C=O...HN Met или структура, стабилизированная водородной связью Phe C=O...HN Met. Соединения (XVI_{3-10,12}) не обнаруживают признаков упорядоченной стабилизированной структуры, и для них характерно наличие множества конформеров, находящихся в равновесии.

Миотропная активность полученных соединений (XVI) и (XVIII) изучалась на изолированной подвздошной кишке морской свинки. В изотоническом режиме изучалась сократительная активность пептидов, а также их способность ингибировать действие вещества Р. Установлено, что соединения типа (XVI) обладают лишь слабой активностью (рис. 3, табл. 3). Кривая соединения (XVI₇) (на рисунке не показана) приблизительно соответствует таковой для вещества (XVI₅). Показано также, что некоторые циклопептиды обладают способностью ингибировать действие вещества Р (рис. 4, табл. 3). Наиболее активным оказалось соединение (XVI₅) (IC₅₀ = 3,2 · 10⁻⁶ М), которые при низких концентрациях являются антагонистом, а при более высокой концентрации обнаруживает агонистические свойства.

В изометрическом режиме, отличающемся от изотонического более высокой чувствительностью, изучена селективность действия циклопептидов. Известно, что производные вещества Р могут вызвать сокращение изолированного органа как воздействием на рецепторы типа NK-1, которые в физиологических условиях связывают вещество Р, так и другими путями. Для подавления неспецифических эффектов опыты проводились (рис. 5) в присутствии смеси блокаторов биохимических систем [10]. Во всех случаях, когда опыты проводились в присутствии ингибиторов, обнаружено уменьшение эффекта. Очевидно, что, чем меньше расстояние между кривыми на рис. 5, тем выше селективность действия данного циклопептида. Таким образом, наиболее специфичными по отношению к рецептору NK-1 оказались соединения (XVI₃), (XVI₄) и (XVI₁₂), наименее специфичными — соединения (XVI₅) и (XVI₈). Изучение миотропной ак-

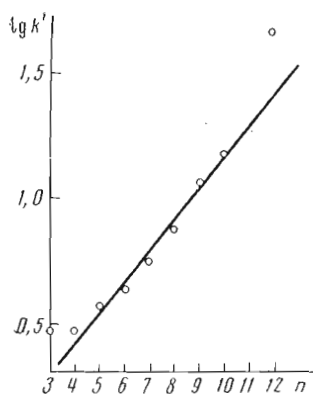


Рис. 1. Зависимость коэффициента емкости k' при ВЭЖХ соединений типа (XVI) от количества метиленовых групп n . Носитель — Zorbax C_8 ; элюент — CH_3CN — 0,2 M CH_3COONH_4 (2 : 3). $k' = (t_R - t_0)/t_0$, где t_R — время удерживания испытуемого соединения, t_0 — несорбируемого вещества

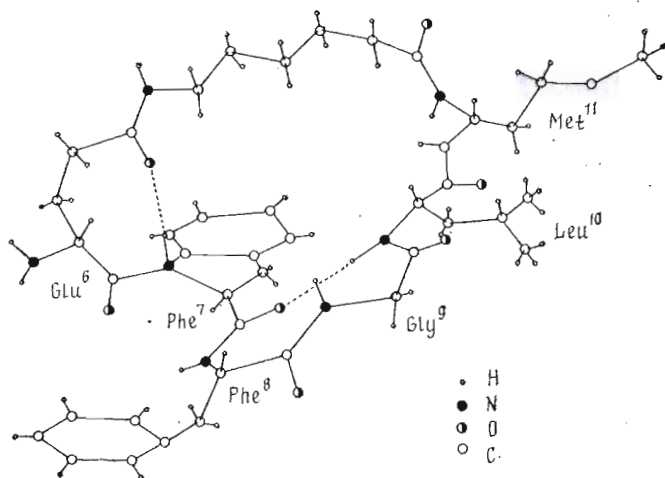


Рис. 2. Вторичная структура циклонептида (XVI₅) по данным ЯМР

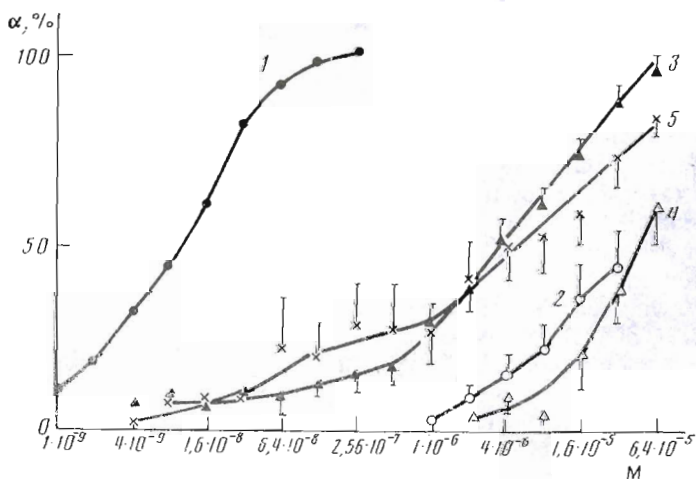
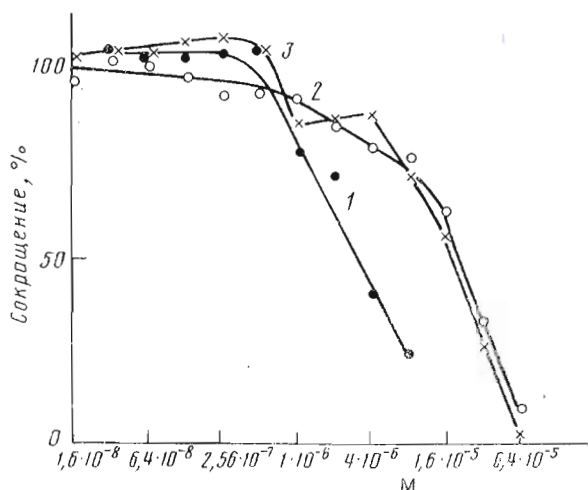


Рис. 3. Кривые «концентрация — эффект» на изолированной кишке морской свинки: 1 — вещество P ($n = 30$), 2 — соединение (XVI₃) ($n = 8$), 3 — соединение (XIV₄) ($n = 10$), 4 — соединение (XVI₅) ($n = 8$), 5 — соединение (XVI₆) ($n = 6$); n — число опытов. Условия изотонические

тивности ациклических пептидов (XVIIIa, б) показало, что в этом отношении они намного превосходят циклонептиды типа (XVI) (рис. 6). В этих экспериментах вещество P проявило активность, характеризующуюся параметрами $\alpha = 1,0$ и $pD_2 = 9,82 \pm 0,29$, соединение (XVIIIa) — $0,97 \pm 0,03$ и $9,19 \pm 0,25$, а соединение (XVIIIб) — $0,95 \pm 0,05$ и $8,73 \pm 0,17$

Рис. 4. Ингибирование циклопептидами субмаксимального сокращения кишки морской свинки, вызываемого веществом Р ($1,6 \cdot 10^{-8}$ М): 1 — соединение (XVI_3) ($n = 3$), 2 — соединение (XVI_8) ($n = 4$), 3 — соединение (XVI_9) ($n = 4$). n — число опытов. Условия изотонические



соответственно, т. е. что соединения ($XVIIIa$) и ($XVIIIb$) обладают 22 и 8% от активности вещества Р.

При изучении влияния соединений типа (XVI) на артериальное давление наркотизированных крыс установлено, что эти вещества были неактивны или проявляли лишь слабую активность [2]. Ациклический пептид ($XVIIIa$) в дозе 40 мкг/кг понижал артериальное давление на 15 мм рт. ст. в течение 2 мин, в дозе 0,4 мг/кг — на 20 мм рт. ст. (4 мин). Соединение ($XVIIIb$) в дозе 0,43 мг/кг понижало артериальное давление на 6 мм рт. ст. (6 мин) с последующим его повышением на 8 мм рт. ст. (4 мин).

Исследована также способность соединений типа (XVI) ингибировать связывание радиоактивного производного вещества Р с мембранами мозга крысы [11]. При концентрации циклопептидов 10–15 мкМ наблюдалось уменьшение количества связанного радиоактивного производного: для соединения (XVI_4) на 13%, (XVI_5) — 20, (XVI_6) — 5, (XVI_8) — 10%. Для наиболее активного циклопептида (XVI_5) $IC_{50} = 3$ мкМ, что на 4 порядка выше, чем у вещества Р. Таким образом, данные циклопептиды лишь слабо конкурируют с веществом Р при его связывании с рецепторами в мембранах мозга крысы.

Результаты нашего исследования дают право предполагать, что структуры со сближенными амидными группами Gln^6 и С-конца, содержащие β -изгиб в С-концевом участке и (или) водородную связь Gln^6 $C^{\alpha}O \cdots HN$ Phe^7 , в «биологически активной» конформации вещества Р не реализу-

Таблица 3

Миотропные свойства циклопептидов типа (XVI) в изотонических условиях

Соединение	Агонистические свойства			Антагонистические свойства	
	ED_{50} , М	Сокращение, % *	Относительная активность	ID_{50} , М	Ингибирование сокращения, % / концентрация, М
Вещество Р	$4,2 \cdot 10^{-9}$	—	100	—	—
(XVI_3)	$1,9 \cdot 10^{-9}$ **	—	<0,015	—	0/1,6 · 10 ⁻⁵
(XVI_4)	$1,25 \cdot 10^{-5}$ **	—	0,105	—	~20/3,2 · 10 ⁻⁵
(XVI_5)	$4 \cdot 10^{-6}$	—	0,009	$3,2 \cdot 10^{-6}$	—
(XVI_6)	$4,7 \cdot 10^{-5}$	—	0,009	—	~60/6,4 · 10 ⁻⁵
(XVI_7)	$5 \cdot 10^{-6}$	—	0,084	—	~60/6,4 · 10 ⁻⁵
(XVI_8)	$4,7 \cdot 10^{-5}$	—	0,009	—	—
(XVI_9)	—	0	0	$1,9 \cdot 10^{-5}$	—
(XVI_{10})	—	~30	~0,003	$1,9 \cdot 10^{-5}$	—
(XVI_{11})	—	0	0	—	10—20/6,4 · 10 ⁻⁵
(XVI_{12})	—	0	0	—	10—20/6,4 · 10 ⁻⁵

* При концентрации $6,4 \cdot 10^{-5}$ М.
** ED_{50} .

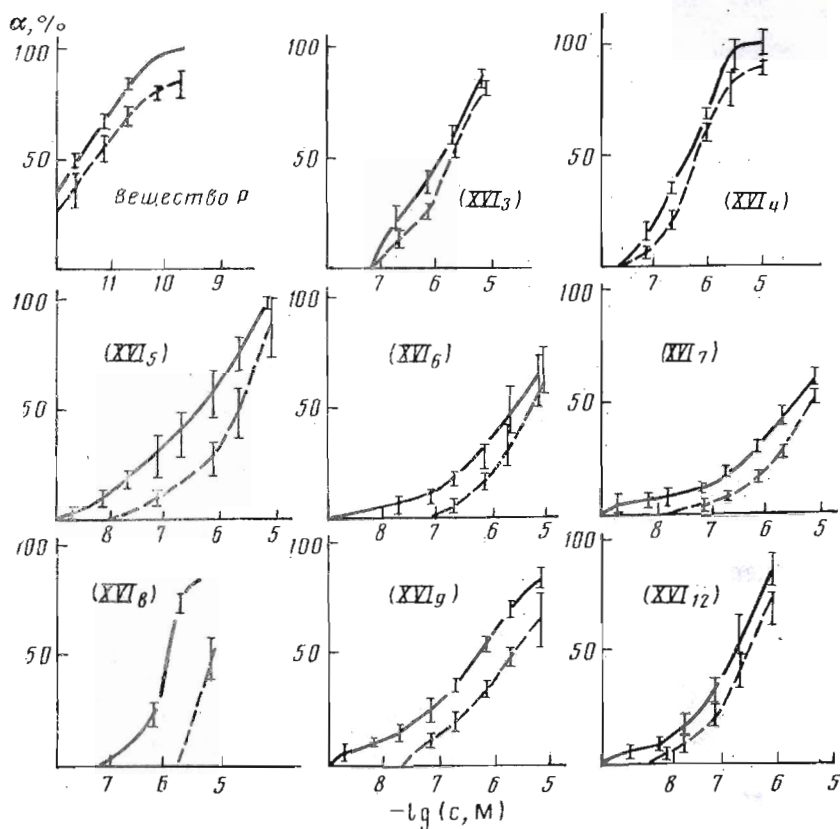


Рис. 5. Миотропное действие вещества Р и его циклоаналогов (XVI) на кишку морской свинки в отсутствие (—) и в присутствии смеси атропина ($5,1 \cdot 10^{-6}$ М), дифенгидрамина ($5,9 \cdot 10^{-6}$ М) и индометацина ($4,2 \cdot 10^{-6}$ М) (---). Условия изометрические

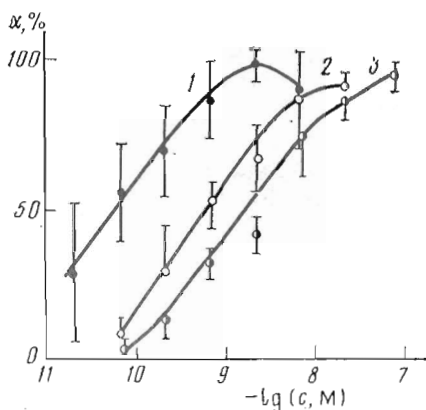


Рис. 6. Кумулятивные кривые «концентрация — эффект» на изолированной кишке морской свинки для вещества Р (1), соединения (XVIIIa) (2) и соединения (XVIIIb) (3). Условия изометрические

ются. Низкую активность циклопептидов типа (XVI) нельзя считать только результатом замещения амидных протонов алкильными группами. Об этом свидетельствует относительно высокая активность соединений (XVIIIa, б). Полученные результаты косвенно подтверждают предположение Р. Швицера и др. [12] о том, что вещество Р действует в виде α -спирали. Это подтверждают также данные о высокой активности циклических аналогов вещества Р, α -спиральная конформация которых стабилизирована дисульфидной связью [13].

Заслуживают внимания обнаруженные нами у некоторых циклопептидов типа (XVI) антагонистические свойства, проявляющиеся при минимальной модификации природного пептида. Ранее известные антагонисты вещества Р характеризуются большими изменениями в первичной структуре. В частности, для этого в молекулу вводятся остатки D-ами-

нокислост, например триптофана [14]. Полагаем, что соединение (XVI_5) может стать отправной точкой для создания принципиально новых, более активных антагонистов вещества Р.

Экспериментальная часть

Для синтеза использовали производные аминокислот производства фирм Reanal (Венгрия) или «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. Индивидуальность полученных соединений проверяли с помощью ТСХ на пластинках Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} , а также используя ВЭЖХ. Приведены хроматографические подвижности R_f на пластинках Silufol UV-254 в системах: гексан — эфир, 2 : 3 (А); хлороформ — метанол — гексан, 10 : 1 : 3 (Б); хлороформ — этанол — этилацетат — уксусная кислота — вода, 85 : 5 : 8 : 2 : 0,25 (В); система В — изопропиловый спирт, 4 : 1 (Г); хлороформ — этанол — *n*-бутанол — вода, 17 : 8 : 4 : 0,8 (Д); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5, верхняя фаза (Е); хлороформ — уксусная кислота — вода, 41 : 27 : 6 (Ж). Электрофорез осуществляли на бумаге FN-16 (ГДР) в 1 М уксусной кислоте. Приведена подвижность относительно гистидина (E_{His}). Вещества обнаруживали в УФ-свете, а также с помощью нингидрина или хлорбензидина.

Строение соединений подтверждалось ^1H -ЯМР-спектроскопией. Спектры получали на приборах Bruker WH 90 или WH 360 (ФРГ), химические сдвиги, форма и интенсивность сигналов соответствовали предполагаемому строению молекул веществ. 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, 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).

Адрос-ОС₆H₅ (I). В 1-л колбу, снабженную обратным воздушным холодильником, помещали 30,9 г (0,156 моль) 2-(1-адамантил)-пропанола-2 [5], 300 мл гексана и 100 мл безводного тетрагидрофурана. Перемешивали до растворения, затем в атмосфере аргона добавляли 8,5 г (0,27 моль) металлического калия в виде мелких, разрезанных под слоем толуола кусочков. Выдерживали 20 ч, декантировали. Полученный раствор охлаждали до -70° С, в течение 45 мин добавляли раствор 20,2 мл (0,16 моль) фенолового эфира хлоругольной кислоты в 70 мл гексана. Выдерживали 20 ч при 18° С. Фильтровали, фильтрат упаривали. Маслянистый остаток закристаллизовали перемешиванием со смесью этанол — вода (7 : 3). Полученный продукт перекристаллизовали из спирта — воды. Выход 25,5 г (52%). Т. пл. 62—65° С (лит. [5]: 72° С), R_f 0,69 (А).

Адрос-N₂H₃ (II). 39,7 г (0,126 моль) соединения (I) перемешивали с 1 л этанола до растворения. Добавляли 62 мл гидразин-гидрата, выдерживали 20 ч при 20° С. Упаривали, к остатку добавляли 1 л воды. Образовавшийся осадок отфильтровывали, перемешивали с 1 л воды, снова фильтровали, высушивали в эксикаторе над P_2O_5 . Полученный продукт перемешивали с 0,5 л гексана, отфильтровывали, высушивали. Выход 26,1 г (82%). Т. пл. 168—171° С. R_f 0,20 (А).

Адрос-N₃ (III). 0,51 г (2,0 ммоль) соединения (II) растворяли в 40 мл ацетонитрила, охлаждали до -25°, добавляли смесь 6 М HCl (1 мл) и ацетонитрила (2 мл), затем 5 М раствор NaNO_2 (0,41 мл). Выдерживали 15 мин при -25° С, добавляли 2 М раствор Na_2CO_3 до pH 8. Упаривали при 0° С и высушивали MgSO_4 , фильтровали и упаривали. Остаток обрабатывали 10 мл гексана, фильтровали, фильтрат упаривали. Получили желтоватые кристаллы, имеющие запах черники. Выход 0,40 г (75%), Т. пл. 79,5° С. R_f 0,77 (А).

Adpos-Glu(OBzl)-OH (IV). а) К охлажденному до 0° С раствору 19,6 г (82,8 ммоль) *H-Glu(OBzl)-OH* [15] и 10,2 мл (82,8 ммоль) тетраметилгуанидина в 300 мл DMF добавляли 21,8 г (82,8 ммоль) соединения (III) и выдерживали 3 сут при 20° С. Упаривали при 26° С, остаток растворяли в смеси 300 мл воды и 50 мл гексана. Водный слой отделяли, охлаждали до 0° С и нейтрализовали 5% раствором KHSO_4 до pH 4, экстрагировали эфиром (2 × 300 мл). Объединенные эфирные экстракты сушили MgSO_4 и упаривали. Выход маслообразного продукта 32,5 г (86%).

б) К охлажденному до -5° С раствору 2,5 г (10 ммоль) соединения (II) в 35 мл DMF добавляли 10 мл (40 ммоль) 4 М раствора HCl в диоксане, охлаждали до -25° С и добавляли 1,16 мл (10 ммоль) *трет*-бутилнитрита. Перемешивали 2 ч при -20° С, добавляли 6,84 мл (40 ммоль) диизопропилэтиламина, охлажденный раствор 2,37 г (10 ммоль) *H-Glu(OBzl)-OH* [15] и 1,24 мл (10 ммоль) тетраметилгуанидина в 20 мл DMF. Затем добавляли еще 1,71 мл (10 ммоль) диизопропилэтиламина и выдерживали 20 ч при 20° С. Упаривали, остаток обрабатывали аналогично способу «а». Выход 3,1 г (68%). $[\alpha]_D^{20}$ 0° (с 1, этанол). R_f 0,22 (А), 0,32 (Б).

H-Phe-Gly-OH (V). 6,44 г (18 ммоль) *Z-Phe-Gly-OH* [6] растворяли в 200 мл этанола и 50 мл воды и гидрировали 5 ч в присутствии 0,5 г Pd -черни. Фильтровали, фильтрат упаривали, остаток перекристаллизовывали из 50 мл этанола. Выход 4,0 г (количественный). Т. пл. 251—252° С с разл. $[\alpha]_D^{20}$ +86,9° (с 1, метанол). R_f 0 (Б), 0 (Д), 0,34 (Е), 0,67 (Ж). E_{HIS} 0,57.

Woc-Phe-Phe-Gly-OH (VI). К раствору 7,78 г (18 ммоль) *Woc-Phe-OPfp* [16] в 250 мл безводного CH_2Cl_2 добавляли 4,0 г (18 ммоль) соединения (V) и 6,15 мл (36 ммоль) диизопропилэтиламина и перемешивали 24 ч при 20° С. Затем реакционную смесь промывали 5% KHSO_4 (2 × 50 мл) и 50 мл воды. Сушили MgSO_4 , фильтровали, фильтрат упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 7,6 г (91%). Т. пл. 96—100° С. $[\alpha]_D^{20}$ -28,5° (с 1, метанол). R_f 0,23 (Б), 0,46 (В), 0,92 (Г), 0,98 (Д).

Woc-Met-ONb (VII). 20,0 г (80,2 ммоль) *Woc-Met-OH*, 11,2 мл (80,2 ммоль) триэтиламина и 17,3 г (80,2 ммоль) *n*-нитробензилбромида растворяли в 300 мл DMF и выдерживали 72 ч при 20° С. Упаривали, остаток растворяли в 250 мл этилацетата и промывали последовательно (по 250 мл) 5% KHSO_4 , водой, 5% NaHCO_3 , снова водой. Сушили Na_2SO_4 , фильтровали, фильтрат упаривали. Остаток закристаллизовывали растиранием с гексаном. Выход 23,0 г (75%). Т. пл. 54—55° С. $[\alpha]_D^{20}$ -28,1° (с 1, этанол). R_f 0,34 (А), 0,96 (Б), 0,88 (В).

H-Met-ONb-HCl (VIII). К раствору 10,0 г (26 ммоль) соединения (VII) в 25 мл этилацетата добавляли 33 мл (0,13 моль) 3,9 М HCl в этилацетате и выдерживали 1 ч при 20° С. Упаривали при 20° С, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 8,0 г (96%). Т. пл. 129—130° С. $[\alpha]_D^{20}$ +8° (с 1, этанол). R_f 0,28 (Г), 0,58 (Д), 0,51 (Е), 0,48 (Ж). E_{HIS} 0,69.

Woc-Leu-Met-ONb (IX). К раствору 18,4 г (73 ммоль) *Woc-Leu-OH* · H_2O и 23,6 г (73 ммоль) соединения (VIII) в 0,5 л CH_2Cl_2 добавляли 10,2 мл (73 ммоль) диизопропилэтиламина. Полученную смесь охлаждали до -10° С, добавляли охлажденный раствор 15,2 г (73 ммоль) дициклогексилкарбодимид в 100 мл безводного CH_2Cl_2 и выдерживали 18 ч при -10° С. Фильтровали, фильтрат промывали последовательно 5% KHSO_4 (2 × 100 мл), 5% NaHCO_3 (2 × 100 мл) и 100 мл воды. Сушили MgSO_4 , фильтровали, фильтрат упаривали. Остаток закристаллизовывали растиранием с гексаном. Выход 33,0 г (92%). Т. пл. 103—105° С с разл. $[\alpha]_D^{20}$ -39,0° (с 1, метанол). R_f 0,67 (Б), 0,58 (В), 0,92 (Г).

H-Leu-Met-ONb-HCl (X). 10,0 г (20 ммоль) соединения (IX) суспендировали в 100 мл безводного диоксана и добавляли 16,7 мл (0,1 моль) 6 М раствора HCl в диоксане. Перемешивали 5 ч при 20° С. Упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход

8,7 г (количественный). $[\alpha]_D^{20} -5,7^\circ$ (с 1, метанол). R_f 0 (Б), 0 (В), 0,28 (Г), 0,29 (Д), 0,49 (Ж). E_{HIS} 0,58.

Boc-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-ONb (XI). К охлажденному (0°C) раствору 7,66 г (17 ммоль) соединения (X) в 150 мл безводного CH_2Cl_2 добавляли 3,6 г (20 ммоль) пентафторфенола и 4,03 г (20 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Перемешивали 1 ч при 0°C . Затем добавляли раствор 8,7 г (20 ммоль) соединения (VI) в 100 мл безводного CH_2Cl_2 и 10,2 мл (60 ммоль) диизопропилэтиламина. Выдерживали 24 ч при 20°C . Реакционную смесь промывали 5% KHSO_4 (2×100 мл) и 5% NaHCO_3 (2×100 мл) и 100 мл воды. Сушили MgSO_4 , фильтровали, фильтрат упаривали, остаток хроматографировали на колонке (200 г силикагеля, элюировали смесью системы А с хлороформом (1 : 8)). Фракцию элюата, содержащую соединения (XI), упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с безводным эфиром. Выход 9,55 г (69%). Т. пл. $115-118^\circ\text{C}$ с разл. $[\alpha]_D^{20} -36,8^\circ$ (с 1, метанол). R_f 0,21 (Б), 0,44 (В), 0,90 (Г), 0,97 (Д).

H-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-ONb \cdot HCl (XII) синтезировали из соединения (IX) аналогично получению соединения (X). Выход 98%. Т. пл. $115-123^\circ\text{C}$ с разл. $[\alpha]_D^{20} -49,2^\circ$ (с 1, метанол). R_f 0 (Б), 0,04 (В), 0,43 (Г), 0,79 (Д), 0,65 (Е), 0,81 (Ж). E_{HIS} 0,40.

Adpoc-Glu(OBzl)-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-ONb (XIII) синтезировали из соединений (IV) и (XII) аналогично получению соединения (XI). Очищали хроматографически (200 г силикагеля, элюировали сначала хлороформом (2 л), затем системой А (2 л)). Фракцию элюата, содержащую соединения (XIII), упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с гексаном. Выход 60%. Т. пл. $178-182^\circ\text{C}$ с разл. $[\alpha]_D^{20} -35,8^\circ$ (с 1, метанол). R_f 0,20 (Б), 0,36 (В), 0,95 (Г).

Adpoc-Glu(N_2H_3)-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-N_2H_3 (XIV). К раствору 3,6 г (6,0 ммоль) соединения (XIII) в 90 мл DMF добавляли 6 мл (12 ммоль) гидразин-гидрата и выдерживали 48 ч при 20°C . Затем упаривали, остаток перемешивали с 30 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали водой. Высушивали при 1 мм рт. ст. в присутствии H_2SO_4 . Выход 2,7 г (88%). Т. пл. $178-180^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} -27,3^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,03 (Б), 0,13 (В), 0,86 (Г).

Adpoc-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH-(CH_2)_{3-10, 12}-NH^+ (XV_{3-10, 12}). Раствор 0,5 г (0,5 ммоль) соединения (XIV) в 20 мл DMF охлаждали до -30°C , добавляли 1,16 мл (4 ммоль) 3,45 М раствора HCl в диоксане и 0,12 мл (1,0 ммоль) *трет*-бутилниритра и выдерживали 1 ч при -30°C . Добавляли 0,68 мл (4,0 ммоль) диизопропилэтиламина и 0,5 ммоль диамин типа $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ($n = 3-10, 12$). Выдерживали 24 ч при -18°C . Упаривали, остаток закристаллизовывали обработкой с гексаном. Растворили в 50 мл хлороформа и очищали хроматографически (100 г силикагеля, элюировали хлороформом (1,5 л), смесью хлороформ — система Б (10 : 1, 1 л; затем 5 : 1, 1 л) и системой Б (1 л)). Фракцию элюата, содержащую соединения типа (XV), упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с гексаном. Выход и свойства полученных соединений приведены в табл. 1.

H-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH(CH_2)_{3-10, 12}-NH^+ \cdot HCl (XVI_{3-1, 12}). Раствор 0,1 ммоль соединения типа (XV) в 3 мл безводного CH_2Cl_2 охлаждали до -8°C , добавляли 3 мл 6% раствора HCl в CH_2Cl_2 и выдерживали 5 мин при -8°C . Упаривали без повышения температуры, остаток закристаллизовывали растиранием с гексаном. Фильтровали, осадок выдерживали при 1 мм рт. ст. в присутствии KOH . Выход и физические свойства полученных соединений типа (XVI) приведены в табл. 2.

Adpoc-Glu(NHCH_3)-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NHCH_3 (XVIIa) синтезировали из соединения (XIV) и 14,8% водного метиламина аналогично получению соединений типа (XV). Очищали хроматографически (сплосорб C_{13} , элюировали смесью CH_3CN — вода (1 : 1, 2 : 1)). Фракцию элюата, содержащую чистый пептид (XVIIa), упаривали, остаток закристаллизовывали

вали растиранием с гексаном. Выход 37%. Т. пл. 193—197° С с разл. $[\alpha]_D^{20}$ —26,8° (с 0,5, DMF). R_f 0,16 (Б), 0,10 (В), 0,72 (Г).

Adpos-Glu(NHC₃H₇)-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NHC₃H₇ (XVIIб) синтезировали из соединения (XIV) и *n*-пропиламина аналогично получению соединений типа (XV). Очищали на силикагеле, элюировали смесью система Б — хлороформ (1 : 1), затем системой Б. Фракцию элюата, содержащую соединение (XVIIб), упаривали, остаток растворяли в 10 мл смеси CH₃CN — вода (2 : 1). Снова очищали на силасорбе C₁₈, элюировали смесью CH₃CN — вода (2 : 1, 3 : 1), затем чистым CH₃CN. Фракцию элюата, содержащую чистое соединение (XVIIб), упаривали, остаток закристаллизовывали растиранием с гексаном. Выход 18%. Т. пл. 220—222° С. $[\alpha]_D^{20}$ —28,0° (с 0,5, DMF). R_f 0,20 (Б), 0,17 (В), 0,89 (Г).

H-Glu(NHC₃H₇)-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NHC₃H₇·HCl (XVIIIa) синтезировали из соединений (XVIIa) аналогично получению соединений типа (XVI). Выход 67%. Т. пл. 122—126° С с разл. $[\alpha]_D^{20}$ —18,0° (с 0,5, CH₃COOH). R_f 0,37 (Е), 0,38 (Ж). E_{His} 0,41.

H-Glu(NHC₃H₇)-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NHC₃H₇·HCl (XVIIIб) синтезировали из соединений (XVIIб) аналогично получению соединений типа (XVI). Выход 89%. Т. пл. 199—201° С. $[\alpha]_D^{20}$ —19,0° (с 0,5, CH₃COOH). R_f 0,64 (Е), 0,53 (Ж). E_{His} 0,36.

Определение миотропной активности на изолированной подвздошной кишке (ileum) морской свинки. а) *Изотонические условия*. Опыты проводились на терминальном участке кишки самок морской свинки в 5-мл сосуде с трис-тиродовым раствором состава (г/л): NaCl 9,0, KCl 0,2, CaCl₂ 0,2, MgCl₂ 0,1, глюкоза 1,0, 0,2 М трис-буфер 5 мл при 37° С, pH 7,4, и барботировании кислородом. Спустя 30 мин приступали к введению возрастающих концентраций проверяемых соединений (интервалы введения 5 мин) и регистрировали изотонические сокращения. Нагрузка на препарат 2 г. Время контакта органа с испытуемым веществом достигало 30 с. В опытах на антагонизм после 3 мин инкубации с испытуемым пептидом наблюдали подавление субмаксимальной контракции, вызываемой веществом Р ($1,6 \cdot 10^{-8}$ М).

б) *Изометрические условия*. Взрослых морских свинок обоего пола массой 400—500 г убивали ударом в затылок и обескровливанием. Отступив 5 см от илеоцекального клапана, вырезали участки кишки длиной 2 см и помещали их в раствор Тирода в ванночках для изолированных препаратов объемом 10 мл. Температура 37° С, барботирование воздухом. Нагрузка на препарат 1 г, время предварительной промывки 45 мин. Регистрацию сокращений производили в изометрическом режиме датчиком ТВ-611Т, соединенным с самописцем Nihon Kohden Polygraph RM-600 (Япония). Для опытов с ингибиторами изолированный орган предварительно в течение 3 мин обрабатывали раствором, содержащим сульфат атропина ($5,1 \cdot 10^{-6}$ М), дифенгидрамин ($5,9 \cdot 10^{-6}$ М) и индометацин ($4,2 \cdot 10^{-6}$ М). Вещество Р изучали в концентрациях 10^{-12} — 10^{-9} М, другие пептиды — в концентрациях 10^{-12} — 10^{-5} М. По методу ван Россума [17] вычисляли параметры, характеризующие взаимодействие веществ с рецептором: «внутреннюю активность» (α) и показатель специфического сродства (pD_2).

Определение влияния пептидов на артериальное давление крыс. Белых крыс обоего пола массой 180—200 г наркотизировали внутривенно 26% водным раствором уретана из расчета 0,5 мл на 100 г массы животного. Артериальное давление регистрировали с общей сонной артерии с помощью преобразователя Bentley Trantec Physiological Pressure на двухканальном регистрирующем приборе Gemini (Ugo Basile, Италия). Вещества в дозах 0,4—400 мкг/кг вводили в виде инъекций объемом 0,1 мл на 200 г массы животного.

Опыты на ингибирование связывания радиоактивного производного вещества Р мембранами мозга крысы его циклическими аналогами подробно описаны в публикации [11].

1. Мауропс Г. Х., Мутулис Ф. К., Мутуле И. Э., Свейрскис Ш. В., Кукайн Э. М., Голубева В. В., Клуша В. Е., Чипенс Г. И. // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим. 1988. № 6. С. 744—749.
2. Мутулис Ф. К., Мутуле И. Э., Мауропс Г. Х., Секацис И. П., Григорьева В. Д., Кукайн Э. М., Голубева В. В., Мышлякова Н. В., Клуша В. Е., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 9. С. 1276—1278.
3. Никифорович Г. В., Балодис Ю. Ю., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 5. С. 645—654.
4. Sandberg B. E. B., Bishai W. R., Hannah P. // Peptides 1984. Proc. of the 18th Eur. Pept. Symp. / Ed. Ragnarsson U. Stockholm: Almqvist Wiksell International, 1984. P. 369—372.
5. Kalbacher H., Voeller W. // Angew. Chem. 1978. В. 90. № 12. P. 998—999.
6. Мутуле И. Э., Мутулис Ф. К., Эрглис Д. П., Якстия Д. А., Секацис И. П., Розите С. Х., Григорьева В. Д., Мисина И. П., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 299—307.
7. Саулитис Ю. Б., Лиепиньш Э. Э. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 168—175.
8. Саулитис Ю. Б. Исследование пространственного строения пептидных гормонов и их циклических аналогов методами двумерной спектроскопии ЯМР. Дис. ... канд. хим. наук. Рига: ИХ ЛатвАН, 1987. С. 1—169.
9. Shenderovich M. D., Nikiforovich G. V., Saulitis J. B., Chipens G. I. // Biophys. Chem. 1988. V. 31. № 1. P. 163—173.
10. Regoli D., Drapeau G., Dion S., D'Orleans-Juste P. // Life Sci. 1987. V. 40. № 2. P. 109—117.
11. Лазакович Е. М., Мутуле И. Э., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 313—317.
12. Schwyzler R., Erne D., Rolka K. // Helv. chim. acta. 1986. V. 69. № 8. P. 1789—1797.
13. Ploux O., Lavielle S., Chassaing G., Julien S., Marquet A., D'Orleans-Juste P., Dion S., Regoli D., Beaujouan J.-C., Bergstrom L., Torrens Y., Glowinski J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 22. P. 8095—8099.
14. Escher E., Parent P., Mizrahi J., D'Orleans-Juste P., Dion S., Drapeau R., Regoli D. // Tachykinin Antagonists / Eds Hakanson R., Sundler F. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1985. P. 267—276.
15. Гершкович А. А., Кубирев В. К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наукова думка, 1987. С. 195.
16. Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I. // Lieb. Ann. 1973. В. 9. S. 1421—1429.
17. van Rossum J. M. // Arch. Int. Pharmacodyn. 1963. V. 143. № 3—4. P. 299—300.

Поступила в редакцию
15.VI.1990

После доработки
6.III.1991

F. K. MUTULIS, I. E. MUTULE, G. H. MAUROPS, J. BERGMANN*,
N. V. MISHLYAKOVA, G. M. STRAZDA, E. E. LIEPINS, J. B. SAULITIS,
V. D. GRIGORYEVA, J. J. BALODIS, V. I. TSETLIN**, J. M. LAZAKOVICH**

CYCLIC ANALOGUES OF SUBSTANCE P.

III. CYCLO-(6ⁿ → OLIGOMETHYLENEDIAMINE ← 11)

SUBSTANCE P⁶⁻¹¹ HEXAPEPTIDES

*Institute of Organic Synthesis, Latvian Academy of Sciences, Riga; *Central Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the GDR, Berlin; **M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Cyclic analogues of substance P of the formula cyclo-[Glu¹-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH(CH₂)_nNH-], where $n = 3-10, 12$, and open-chain analogues (KVIIIa, b) H-Glu-(NHR)-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NHR, where $R = -CH_3, -CH_2CH_2CH_3$, were synthesized. By NMR spectroscopy it was found that cyclo-compounds with $n = 3-8$ have regularly arranged structures, stabilized by intramolecular hydrogen bonds. Substances of this type showed $\leq 0.1\%$ of the substance P activity on the guinea pig ileum, but some of them antagonize the natural peptide (for compound with $n = 5$ $EC_{50} = 3.2 \cdot 10^{-6}$ M). The open-chain compounds proved to have rather high myotropic activity, viz., 22% ($R = -CH_3$) and 8% ($R = -CH_2CH_2CH_3$) of the substance P activity.