



УДК 547.962.07

СИНТЕЗ НОВЫХ АНАЛОГОВ БРАДИКИНИНА  
С МОДИФИЦИРОВАННОЙ ПЕПТИДНОЙ ЦЕПЬЮ*Филатова М. П., Крит Н. А., Бесчастная Н. В.**Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР, Москва**Рейссманн З.**Университет им. Ф. Шиллера, Иена, ГДР*

Осуществлен синтез аналогов брадикинина, [Gly<sup>6</sup>, MeArg<sup>9</sup>]брадикинина и [Gly<sup>6</sup>, HuArg<sup>9</sup>]брадикинина путем последовательного ацилирования свободного N<sup>ω</sup>-метиларгинина или аргининовой кислоты активированными эфирами защищенных аминокислот или пептидов. На модельных соединениях изучены особенности ацилирования N<sup>ω</sup>-метиламино- или оксигруппы соединений, содержащих свободную гуанидинную функцию. Показано, что оптимальным методом ацилирования N-метиларгинина и аргининовой кислоты является взаимодействие с *n*-нитрофениловыми эфирами N-ациламинокислот в присутствии 1-оксibenзтриазола. Исследована биологическая активность полученных аналогов и методом КД охарактеризована их пространственная структура.

В ходе изучения зависимости между структурой и биологической активностью брадикинина синтезированы аналоги с модифицированным C-концевым участком, в которых амидная связь между 8-м и 9-м аминокислотными остатками заменена на N-метиламидную и [Gly<sup>6</sup>, MeArg<sup>9</sup>]брадикинин и сложноэфирную — [Gly<sup>6</sup>, HuArg<sup>9</sup>]брадикинин. В предыдущих работах было показано, что такого рода модификации различным образом влияют на активность аналога в зависимости от положения заменяемой амидной связи [1—3]. При этом наиболее интересные результаты — повышение устойчивости к основным ферментам, инактивирующим брадикинин в организме (к пептилдипептидгидролазе (КФ 3. 4. 15. 1), карбоксипептидазе N и карбоксипептидазе B (КФ 3.4.12.3)), при сохранении или даже повышении фармакологической активности получают при модификации C-концевого участка молекулы [2—4]. Это представляется вполне закономерным, так как C-концевой участок (дипептид) является принципиальным для связывания с инактивирующими ферментами. В связи с этим модификации молекулы брадикинина, предпринятые в настоящей работе, могли привести к созданию аналогов, обладающих устойчивым фармакологическим действием, что представляет несом-

Использованы сокращения в соответствии с рекомендациями комиссии по химической номенклатуре IUPAC-IUB: MeArg — N<sup>ω</sup>-метиларгинин, HuArg — α-окси-δ-гуанидино-*n*-валериановая (аргининовая) кислота, NOBt — 1-оксibenзтриазол, OBt — 1-оксibenзтриазоловый эфир, ONb — нитробензиловый эфир, ONp — нитрофениловый эфир, TEA — триэтиламин.

Таблица 1

## Образование N-метиламидной и сложноэфирной связи методом активированных эфиров

Опыт	Активированный эфир	N-Метиламино- или оксикомпонент	Выход, %
1	Z-Phe-ONp	MeArg	<5
2	Z-Phe-ONp	HyArg	<5
3	Z-Phe-ONp	MeArg+HOBT	75
4	Z-Phe-ONp	HyArg+HOBT	80
5	Z-Phe-OBt	MeArg	80
6	Z-Phe-OBt	HyArg	75
7	Z-Phe-ONp	MePhe-OMe	82
8	Z-Phe-ONp	MePhe-Arg(NO <sub>2</sub> )-ONb	80
9	Z-Phe-ONp	MePhe-Arg(NO <sub>2</sub> )-ONb+HOBT	43,5
10	Z-Phe-ONp	MePhe-Arg(NO <sub>2</sub> )-ONb+HOBT+TEA	53
11	Z-Phe-OBt	MePhe-Arg(NO <sub>2</sub> )-ONb	29
12	Z-Phe-ONp	MePhe-Arg	<5
13	Z-Phe-ONp	MePhe-Arg+HOBT	7
14	Z-Phe-ONp	MePhe-Arg+HOBT+TEA	11,5
15	Z-Phe-OBt	MePhe-Arg	5

ненный интерес как для практической медицины, так и для различных биохимических исследований. Для упрощения синтеза были получены глициновые аналоги, так как известно, что замена серина в положении 6 на глицин не изменяет биологическую активность брадикинина [5, 6].

Изучение пространственного строения полученных аналогов и сравнение их структуры со структурой брадикинина позволит получить новые данные о конформационных особенностях молекулы, необходимых для проявления биологического действия природного пептида.

Ключевыми соединениями при синтезе аналогов (1) и (2) явились модифицированные последовательности C-концевого дипептида брадикинина: фенилаланил-N<sup>α</sup>-метиларгинин (5) и фенилаланиларгиновая кислота (6) (см. табл. 2). N<sup>α</sup>-Метиларгинин, необходимый для синтеза, был получен по методу Квитта [7], а аргининовая кислота — действием нитрозилхлорида на хлоридат аргинина и последующим превращением образовавшейся соли α-хлор-δ-гуанидовалериановой кислоты в аргининовую кислоту при кипячении с водой [8].

Поскольку получение производных N<sup>α</sup>-метиларгинина и аргининовой кислоты с защищенными гуанидинной и карбоксильной группами оказалось сложной проблемой, мы решили исследовать возможность использования этих соединений в свободном виде. Наши исследования показали, что для присоединения бензилоксикарбонилфенилаланина к N<sup>α</sup>-метиларгину или аргининовой кислоте по различным причинам (низкий выход продукта реакции, большое количество побочных продуктов, трудности очистки, плохая растворимость в органических растворителях) оказались непригодными методы, обычно используемые для создания N-метиламидной и сложноэфирной связи: дидиклогексилкарбодимидный, хлорангидридный, метод смешанных ангидридов. Эту задачу удалось решить с помощью метода активированных эфиров.

В табл. 1 суммированы полученные нами данные о некоторых особенностях образования N-метиламидной и сложноэфирной связи с использованием метода активированных эфиров. Из таблицы видно, что *n*-нитрофениловый эфир бензилоксикарбонилфенилаланина практически не взаимодействует с N-метиламинной или гидроксильной группой аналогов аргинина, содержащих свободную гуанидинную функцию (опыты 1 и 2). Однако при добавлении 1-оксисбензотриазола, который, как известно, является катализатором ацилирования amino- [9] и оксисоединений [10] активированными эфирами аминокислот, удалось сдвинуть равновесие в

сторону образования желаемых продуктов (опыты 3 и 4). Отработав условия ацилирования  $N^{\alpha}$ -метиларгинина и аргининовой кислоты, мы смогли получить дипептид (3) и дидепсипептид (4) после очистки с выходом 75%. Поскольку в литературе имеются указания на то, что реакции, катализируемые 1-оксибензтриазолом, проходят через промежуточное образование 1-оксибензтриазоловых эфиров [9, 10], нами был проведен синтез соединений (3) и (4) в аналогичных условиях с использованием в качестве ацилирующего агента 1-оксибензтриазолового эфира бензилоксикарбонилфенилаланина (опыты 5 и 6).

Высокий выход продуктов этой реакции позволяет предположить, что катализ с помощью 1-оксибензтриазола в случае ацилирования окси- и  $N^{\alpha}$ -метиламиногруппы аргининовой кислоты и  $N^{\alpha}$ -метиларгинина *n*-нитрофениловыми эфирами заключается в промежуточном образовании 1-оксибензтриазоловых эфиров.

В случае соединений, содержащих защищенные функциональные группы, например метиловый эфир *N*-метилфенилаланина или нитробензиловый эфир *N*-метилфенилаланил- $N^{\omega}$ -нитроаргинина, ацилирование *n*-нитрофениловым эфиром бензилоксикарбонилфенилаланина (опыты 7 и 8) проходит вполне успешно. При этом в отличие от опытов 3 и 4 добавление 1-оксибензтриазола (опыты 9, 10) или ацилирование 1-оксибензтриазоловым эфиром бензилоксикарбонилфенилаланина (опыт 11) приводит к существенному снижению выхода соответствующего трипептида. Изложенные факты указывают на специфичность реакции ацилирования аналогов аргинина — аргининовой кислоты и  $N^{\alpha}$ -метиларгинина.

Интересно, что свободный дипептид *N*-метилфенилаланиларгинин в отличие от его защищенного производного и свободных аналогов аргинина практически не реагирует со всеми исследованными нами реагентами (опыты 12—15). Из рассмотрения молекулярных моделей можно предположить, что это связано с экранированием  $N^{\alpha}$ -метиламиногруппы в свободном дипептиде, в то время как соответствующее защищенное производное имеет конформацию, в которой подход к реакционному центру открыт.

Исследование продуктов реакции *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилфенилаланина с *N*-метиларгинином или аргининовой кислотой (опыты 3, 4) в присутствии 1-оксибензтриазола показало, что реакция протекает неоднозначно. Электрофоретическое разделение продуктов реакции с аргининовой кислотой в присутствии 4-оксибензтриазола (опыт 4) давало 4 зоны, характеризующиеся различной подвижностью (рис. 1). Весовое соотношение продуктов (I) и (II) зависело от времени протекания реакции, поскольку соединение (I) при стоянии в растворе в течение нескольких суток или более медленно в твердом состоянии полностью переходило в соединение (II); если время реакции доводили до 4 сут, то удавалось получить соединение (I) в виде незначительной примеси. В тех случаях, когда время реакции составляло 18—20 ч (что вполне достаточно, чтобы аргининовая кислота практически полностью прореагировала), выход соединения (I) составлял 30—40% от общего количества продуктов, а соединения (II) ~50%. Выход продукта (III) колебался от опыта к опыту от 3 до 12%, причем это соединение было вполне устойчивым. Аргининовая кислота или отсутствовала, или оставалась в количестве 3—5% (IV).

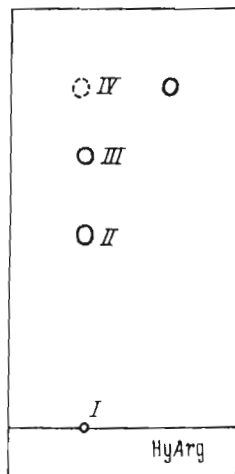
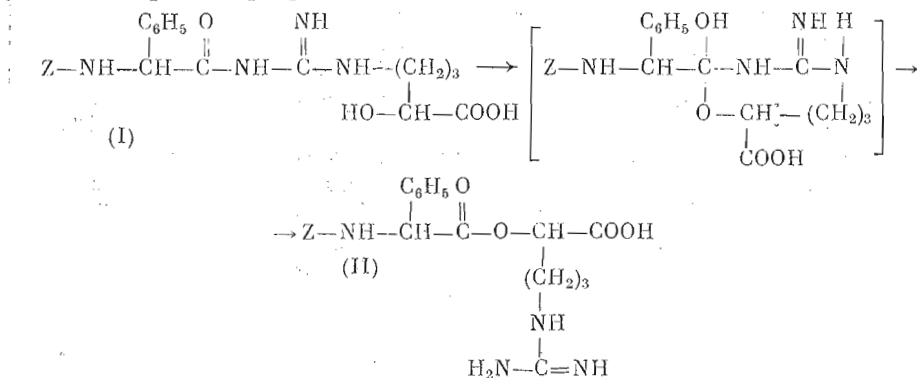


Рис. 1. Электрофоретическая диаграмма продукта реакции  $Z$ -Phe-ONp + H-HyArg-OH в присутствии HOBT (опыт 4, стр. 2) (рН 2,4; 900 В)

При исследовании соединений (I) и (II) было обнаружено, что их мягкий щелочной гидролиз дает лишь аргининовую кислоту и бензилоксикарбонилфенилаланил; снятие бензилоксикарбонильной группы действием НВг в ледяной уксусной кислоте приводило к получению нингидрин-положительных продуктов с одинаковой подвижностью. Данные элементного анализа (I) и (II) совпадали и соответствовали дидепсипептиду бензилоксикарбонилфенилаланиларгининовая кислота. Масс-спектры, УФ- и ИК-спектры и углы вращения соединения (I) после стояния в течение нескольких суток и соединения (II) были одинаковы. Поскольку соединение (I) не движется при электрофорезе при pH 2,4, можно предположить, что оно имеет блокированную гуанидинную функцию. По-видимому, в условиях синтеза происходило замещение гуанидинной группы аргининовой кислоты с образованием соединения (I), которое по механизму N→O-миграции превращалось в соединение (II).



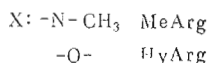
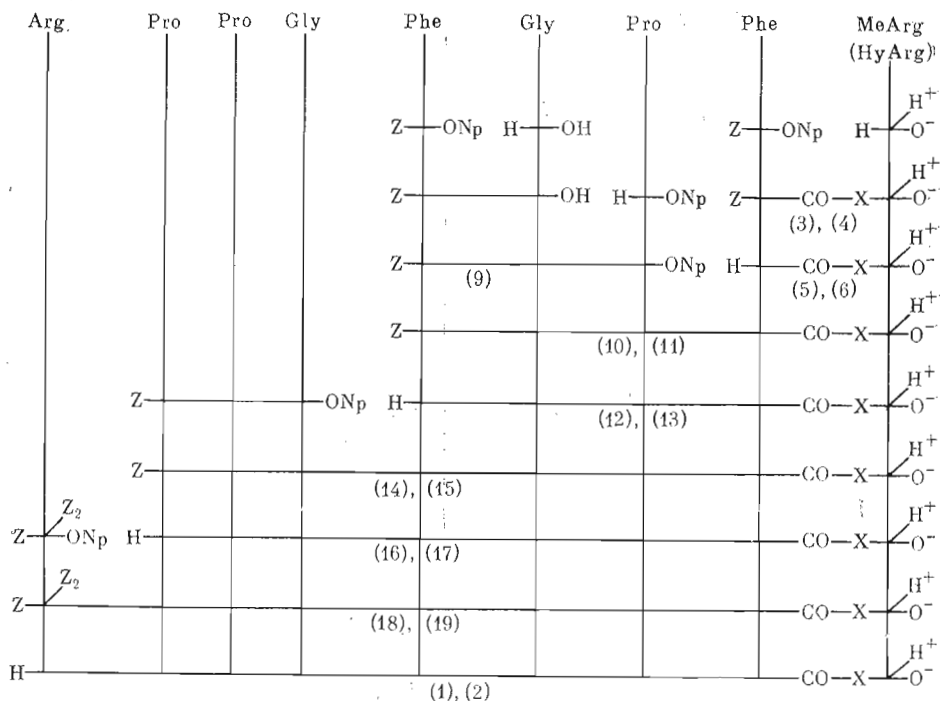
Является ли это превращение основным механизмом течения реакции, или наряду с ним происходит прямое ацилирование оксигруппы, сказать трудно, но возможно, что этот процесс в значительной степени определяет образование дидепсипептида (4).

Структура соединения (III) находится в стадии изучения, однако можно предположить, что оно является результатом превращения диацилированного производного аргининовой кислоты.

Аналогичная картина наблюдалась при электрофоретическом исследовании продукта реакции 1-оксибензтриазолового эфира бензилоксикарбонилфенилаланина (опыт 6) или *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилфенилаланина с N<sup>ω</sup>-метиларгинином в присутствии 1-оксибензтриазола (опыт 3), однако в этом случае соединения (I) и (III) присутствовали лишь в виде примеси, в несколько больших количествах (в отдельных опытах до 10–12%) оставался непрореагировавший N<sup>ω</sup>-метиларгинин. Соединение (3) было очищено аналогично соединению (4) с помощью высоковольтного электрофореза.

Таким образом, с помощью *n*-нитрофениловых эфиров в присутствии 1-оксибензтриазола нам удалось получить исходные для синтеза аналогов брадикинина (1) и (2) соединения — бензилоксикарбонилфенилаланил — N-метиларгинин (3) и бензилоксикарбонилфенилаланил — аргининовая кислота (4). Дальнейший синтез аналогов (1) и (2) осуществлялся исходя из электрофоретически чистых соединений (3) и (4) методом, хорошо зарекомендовавшим себя при получении брадикинина [11], а именно наращиванием пептидной цепи с помощью активированных эфиров защищенных аминокислот или пептидов.

В поисках оптимальной схемы синтеза была исследована возможность присоединения *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилпролина или *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилглицилпролина к дидепсипептиду (6). Однако в этих случаях на стадии выделения оснований пролилфенилаланиларгининовой кислоты или глицилпролилфенилаланилар-



гиновой кислоты происходило образование дополнительных вингидриноположительных соединений и выделение продуктов реакции после конденсации проходило с большими потерями. Оптимальным вариантом синтеза явилось присоединение трипептидного фрагмента, *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилфенилаланилглицилпролина (9), к дидепептиду (6) (схема).

В случае фенилаланил-N<sup>α</sup>-метиларгинина возможно было как последовательное наращивание пептидной цепи с помощью активированных эфиров аминокислот, так и использование активированных эфиров ди- и трипептида. Для унифицирования схемы синтеза аналогов (1) и (2) нами был использован последний вариант (схема).

Бензилоксикарбонильную группу удаляли с помощью НВг в ледяной уксусной кислоте; выделение свободных оснований из соответствующих бромгидратов осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на анионите IRA-410 в OH<sup>-</sup>-форме для аналога с N<sup>α</sup>-метиларгином и IRA-410 в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме для аналога с аргининовой кислотой. Для заключительного снятия бензилоксикарбонильной группы использовалось каталитическое гидрирование над Pd-чернью.

Биологическая активность\* [Gly<sup>6</sup>, MeArg<sup>9</sup>]брадикинина (1) при исследовании пороговой дозы действия соединения на изолированном роге матки крысы оказалась равной активности брадикинина, в то время как [Gly<sup>6</sup>, HyArg<sup>9</sup>]брадикинин (2) был на 3 порядка менее активным. Подробные биохимические исследования будут описаны в следующей публикации.

Для характеристики пространственной структуры синтезированных аналогов и сравнения ее со структурой брадикинина были сняты спектры

\* Биологические испытания проведены в ИВХ АН СССР Г. А. Попковой и М. В. Астаповой и в ИБМХ АМН СССР Т. П. Егоровой в лаборатории биохимии биологически активных пептидов, руководимой проф. Т. С. Пасхиной, за что авторы приносят им искреннюю благодарность.

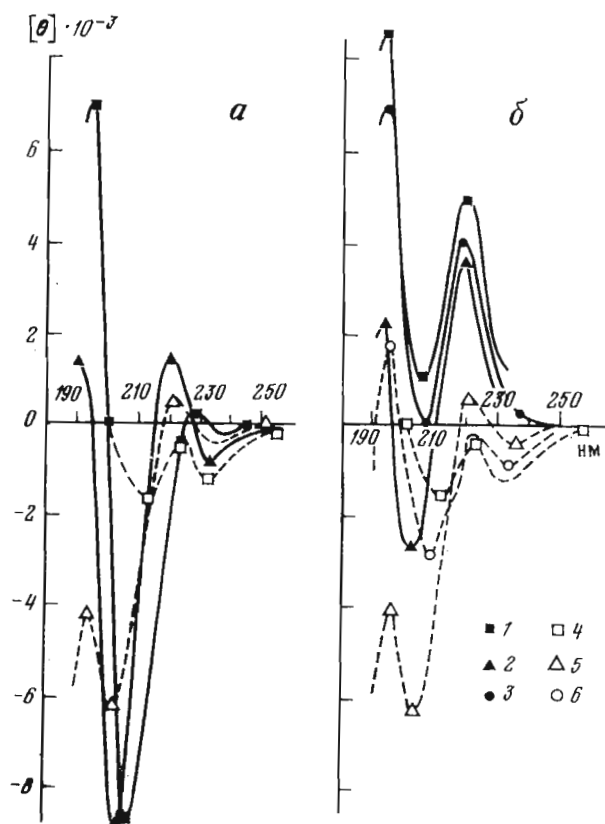


Рис. 2. Спектры КД  $[\text{Gly}^6, \text{MeArg}^9]$ брадикинина (а),  $[\text{Gly}^6, \text{HuArg}^9]$ брадикинина (б) в воде (1), этаноле (2), смеси этанол — пента, 1:1 (3) и брадикинина в соответствующих растворителях (кривые 4–6)

КД этих соединений в области 190–250 нм в растворителях различной полярности (рис. 2) \*. Из рисунка видно, что спектры  $[\text{Gly}^6, \text{MeArg}^9]$ -брадикинина близки к спектрам брадикинина. Для аналога характерно лишь незначительное увеличение величины отрицательного эффекта Коттона при 200 нм, относимого к  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходам амидных групп [12]. Кроме того, в отличие от брадикинина здесь не наблюдается красного сдвига с уменьшением значения этого эффекта при переходе от воды к спирту. Интересно, что такая же особенность отмечена для высокоактивного аналога брадикинина  $[\text{Gly}, \text{PhLac}^8]$ брадикинина с модифицированной амидной группой в положении 8 [13]. Гораздо более существенные отличия наблюдаются в кривых КД  $[\text{Gly}^6, \text{HuArg}^9]$ брадикинина. Для этого малоактивного аналога характерно заметное уменьшение интенсивности полосы при 200 нм и даже изменение ее знака для кривой в этаноле и значительное увеличение интенсивности эффекта Коттона при 220 нм, наблюдаемое для брадикинина лишь при очень низких температурах (от  $-50$  до  $-100^\circ \text{C}$ ).

Таким образом, проведенные исследования подтверждают высокую структурную специфичность молекулы брадикинина, хотя на основании имеющихся данных трудно определить причины отсутствия активности и существенные изменения пространственной структуры в  $[\text{Gly}^6, \text{HuArg}^9]$ -брадикинина и сохранение характерных особенностей молекулы брадикинина в случае  $[\text{Gly}^6, \text{MeArg}^9]$ брадикинина.

\* Спектры КД были сняты в ИБХ АН СССР на дихрографе III, Jobin Ivon (Франция) Н. М. Чехляевой, за что авторы приносят ей искреннюю благодарность.

## Экспериментальная часть

Температуры плавления определены в открытом капилляре и приведены без исправления. Индивидуальность полученных соединений проверяли хроматографией на бумаге FN-16 в системах пиридин — изоамиловый спирт — вода (35:35:30) и *n*-бутанол — вода — уксусная кислота (4:5:1), а также электрофорезом на бумаге в горизонтальном приборе при градиенте потенциала 24 В·см<sup>-1</sup> в 1 М ацетатном буфере (рН 2,4). Препаративный электрофорез осуществляли на бумаге FN-17 в тех же условиях в течение 1,5–2 ч. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin-Elmer, модель 241 (США).

Растворы веществ в органических растворителях высушивали над MgSO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме при температуре не выше 40° С. Выделение свободных оснований из соответствующих хлор- или бромгидратов соединений, содержавших N<sup>α</sup>-метиларгинин, проводилось на смоле IRA-410 в OH<sup>-</sup>-форме в воде или в смеси метанол — вода (1:1), а для соединений с аргининовой кислотой — на смоле IRA-410 в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме в смеси метанол — бензол (1:1). Выходы и константы полученных соединений приведены в табл. 2. Данные элементного анализа по С, Н и N синтезированных соединений соответствовали вычисленным.

*Бензилоксикарбонилфенилаланил-N<sup>α</sup>-метиларгинин (3)*. Смесь 0,71 г N<sup>α</sup>-метиларгинина, 2,08 г *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилфенилаланина и 0,66 г 1-оксибензотриазола в 3 мл диметилформамида перемешивали 48 ч при 20° С. Приливали смесь 50 мл этилацетата и 50 мл сухого эфира, отфильтровывали выпавший осадок (1,8 г) и делили электрофорезом на бумаге (1,5 ч). Получали 1,32 г дипептида (3) ( $E_{\text{Aрг}}$  0,62), 0,034 г соединения (III) ( $E_{\text{Aрг}}$  0,81) и 0,094 г N<sup>α</sup>-метиларгинина ( $E_{\text{Aрг}}$  0,98).

*Бензилоксикарбонилфенилаланил-аргининовая кислота (4)*. Смесь 0,85 г аргининовой кислоты, 2,64 г *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилфенилаланина и 0,85 г 1-оксибензотриазола в 3 мл диметилформамида перемешивали при 20° С 4 сут. Осадок непрореагировавшей аргининовой кислоты отфильтровывали, к маточнику приливали 50 мл этилацетата, выпавший осадок отфильтровывали и делили на бумаге электрофорезом (1,5 ч). Получали 1,62 г соединения (4) ( $E_{\text{Aрг}}$  0,5), 0,048 г соединения (III) ( $E_{\text{Aрг}}$  0,72) и 0,096 г аргининовой кислоты ( $E_{\text{Aрг}}$  0,88).

*Фенилаланил-N<sup>α</sup>-метиларгинин (5)*. К раствору 0,3 г защищенного дипептида (3) в 1,5 мл ледяной уксусной кислоты приливали 2 мл 34%-ного раствора НВг в ледяной уксусной кислоте, выдерживали 45 мин при 20° С, упаривали в вакууме, остаток растирали с сухим эфиром и отфильтровывали бромгидрат дипептида (5) в виде сухого порошка.

Полученный бромгидрат растворяли в 2 мл воды, экстрагировали эфиром и пропускали через колонку с 4 мл смолы IRA-410 в OH<sup>-</sup>-форме в смеси метанол — вода (1:1). Растворитель отгоняли в вакууме и остаток пересаждали из метанола эфиром. Получали 0,16 г дипептида (5).

*Бензилоксикарбонилглицил-пролил-фенилаланил-N<sup>α</sup>-метиларгинин (7)*. Смесь 0,54 г дипептида (3) и 0,89 г *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилглицил-пролина [14] растворяли в 3 мл диметилформамида и выдерживали 20 ч при 37° С. К раствору приливали 40 мл этилацетата, выпавший осадок тетрапептида (7) отфильтровывали, промывали смесью этилацетат — эфир и сухим эфиром.

**n*-Нитрофениловый эфир бензилоксикарбонилфенилаланил-глицил-пролина (9)*. К раствору 0,46 г бромгидрата *n*-нитрофенилового эфира пролина в 3 мл диметилформамида приливали раствор 0,47 г бензилоксикарбонилфенилаланилглицина [15] в 5 мл тетрагидрофурана, охлаждали до 0° С и при перемешивании прикапывали 0,21 мл триэтиламина, а затем быстро приливали раствор 0,3 г N, N'-дихлоргексилкарбодиимида в

Таблица 2

Соединение	Брутто-формула	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$ (с1, МеОН)	Выход, %
(1) [Gly <sup>6</sup> , MeArg <sup>6</sup> ]брадикинин, триацетат	C <sub>50</sub> H <sub>73</sub> N <sub>15</sub> O <sub>10</sub> ·3CH <sub>3</sub> COOH	198–202	–52,0	72,5
(2) [Gly <sup>6</sup> , HuArg <sup>6</sup> ]брадикинин, триацетат	C <sub>49</sub> H <sub>70</sub> N <sub>14</sub> O <sub>11</sub> ·3CH <sub>3</sub> COOH	137	–35,3	93,0
(3) Z-Phe-MeArg	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	174–178	–43,8	75,0
(4) Z-Phe-HuArg	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	75–100	–18,3	75,0
(5) Phe-MeArg	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	93–104	+20,0	75,0
(6) Phe-HuArg *	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>			89,0
(7) Z-Gly-Pro-Phe-MeArg	C <sub>31</sub> H <sub>44</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	120–135	–42,0 **	81,4
(8) Gly-Pro-Phe-MeArg	C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	170–185	–23,1	66
(9) Z-Phe-Gly-ProONp	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	159–162 (из этилацетата)	–14,9 ***	64,5
(10) Z-Phe-Gly-Pro-Phe-MeArg	C <sub>40</sub> H <sub>50</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	118–120	–31,5	42,0
(11) Z-Phe-Gly-Pro-Phe-HuArg	C <sub>39</sub> H <sub>47</sub> N <sub>7</sub> O <sub>9</sub>	114–116	–21,0	71,5
(12) Phe-Gly-Pro-Phe-MeArg	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	132–135	–41,5	96,0
(13) Phe-Gly-Pro-Phe-HuArg *	C <sub>31</sub> H <sub>41</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>			57,0
(14) Z-Pro-Pro-Gly-Phe-Cly-Pro-Phe-MeArg	C <sub>52</sub> H <sub>67</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub>	159–162	–68,8	78,5
(15) Z-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-HuArg	C <sub>51</sub> H <sub>64</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>		–40,0	90,0
(16) Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-MeArg	C <sub>44</sub> H <sub>61</sub> N <sub>11</sub> O <sub>9</sub>	148–150	–44,6	78,0
(17) Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-HuArg *	C <sub>43</sub> H <sub>58</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>			80,0
(18) 3Z-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-MeArg	C <sub>74</sub> H <sub>91</sub> N <sub>15</sub> O <sub>16</sub>	156–159	–46,5 **	62,3
(19) 3Z-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Gly-Pro-Phe-HuArg	C <sub>73</sub> H <sub>88</sub> N <sub>14</sub> O <sub>17</sub>		–32,0	74,0

\* Константы соединений с незащищенной аминокислотной группой, содержащих аргининовую кислоту, не приведены из-за их неустойчивости.

\*\* с1, диметилформамид.

\*\*\* с1, этилацетат



4 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С и оставляли на 4–5 ч при 20° С.

Выпавший осадок отфильтровывали, растворитель упаривали в вакууме, к остатку приливали 50 мл этилацетата и промывали 1% HCl, водой, сушили и остаток растирали с эфиром. Получали 0,5 г хроматографически индивидуального трипептида (9) ( $R_f$  0,76, Silufol, этилацетат — хлороформ, 1 : 1).

*Бензилоксикарбонилфенилаланил - глицил-пролил-фенилаланил-N<sup>α</sup>-метиларгинин (10)*. а) Получали конденсацией 0,27 г свободного дипептида (5) с 0,61 г трипептида (9) в 2 мл диметилформаида аналогично соединению (7). Очистку производили электрофорезом на бумаге (1,5 ч), получали 0,4 г пентапептида (10). б) Смесь 0,11 г *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилфенилаланина с 0,1 г глицил-пролил-фенилаланил-N<sup>α</sup>-метиларгинина (8), полученного из соединения (7) аналогично дипептиду (5), в 3 мл диметилформаида выдерживали 20 ч при 37° С. Обрабатывали аналогично соединению (7) и получали 0,13 г пентапептида (10).

*Бензилоксикарбонилфенилаланил - глицил-пролил-фенилаланил-аргининовая кислота (11)*. Из 0,26 г защищенного дидепсипептида (4) получали бромидат дидепсипептида (6) аналогично соединению (5). Полученный бромидат растворяли в 1 мл метанола и пропускали через колонку с 2 мл смолы IRA-410 в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме в смеси метанол — бензол (1 : 1). Растворитель отгоняли в вакууме и остаток переосаждали из метанола эфиром. Получали 0,16 г дидепсипептида (6). Смесь 0,16 г дидепсипептида (6) и 0,37 г трипептида (9) растворяли в 2 мл диметилформаида и выдерживали 18 ч при 20° С. К реакционной смеси приливали 30 мл этилацетата, выпавший осадок отфильтровывали и промывали этилацетатом, смесью этилацетат — эфир (1 : 1) и эфиром. Получали 0,26 г пентапептида (11).

*Бензилоксикарбонилпролил-пролил-глицил-фенилаланил - глицил - пролил-фенилаланил-N<sup>α</sup>-метиларгинин (14)*. 0,17 г защищенного пентапептида (10) гидрировали в 4 мл метанола над Pd-чернью в течение 6 ч. Катализатор отфильтровывали, растворитель отгоняли в вакууме, остаток переосаждали из метанола эфиром и получали 0,14 г пентапептида (12).

Конденсацией 0,14 г свободного пентапептида (12) с 0,15 г *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилпролил-пролил-глицина [16] в 0,16 мл диметилформаида аналогично соединению (7) получали защищенный октапептид (14).

*Бензилоксикарбонилпролил-пролил-глицил-фенилаланил-глицил-пролил-фенилаланил-аргининовая кислота (15)*. Защищенный пентадепсипептид (11) превращали в свободный депсипептид (13) аналогично соединению (6). Октадепсипептид (15) получали конденсацией 0,07 г свободного пентадепсипептида (13) с 0,076 г *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилпролилпролилглицина в 0,5 мл диметилформаида аналогично соединению (11).

*Трибензилоксикарбониларгинил - пролил - пролил - глицил-фенилаланил-глицил-пролил-фенилаланил-N<sup>α</sup>-метиларгинин (18)*. Из 0,2 г защищенного октапептида (14) получали 0,14 г свободного пептида (16) аналогично соединению (5). Конденсацией 0,1 г свободного октапептида (16) с 0,1 г *n*-нитрофенилового эфира трибензилоксикарбониларгинина в 0,5 мл диметилформаида аналогично соединению (7) получали нонапептид (18), который очищали хроматографией на сефадексе LH-20 в метаноле.

*Трибензилоксикарбониларгинил - пролил - пролил - глицил-фенилаланил-глицил-пролил-фенилаланил-аргининовая кислота (19)*. Из 0,21 г защищенного октадепсипептида (15) получали 0,07 г свободного депсипептида аналогично соединению (6). Конденсацией 0,07 г свободного октадепсипептида (17) с 0,073 г *n*-нитрофенилового эфира трибензилоксикарбониларгинина в 0,5 мл диметилформаида аналогично соединению (11) полу-

чали 0,085 г защищенного нонадепептида (19), который очищали хроматографией на сефадексе LH-20 в метаноле.

*Аргинил-пролил-пролил-глицил-фенилаланил-глицил-пролил-фенилаланил-N<sup>α</sup>-метиларгинин (1)*. 0,027 г защищенного нонадепептида (18) гидрировали в 3 мл смеси метанол — уксусная кислота (10:1) над Pd-чернью в течение 6 ч. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали, остаток пересаждали из метанола эфиром и очищали электрофорезом на бумаге (2 ч).

*Аргинил-пролил-пролил-глицил-фенилаланил-глицил-пролил-фенилаланил-аргининовая кислота (2)*. 0,06 г защищенного нонадепептида (19) растворяли в 3 мл метанола и гидрировали над Pd-чернью в течение 8 ч. Добавляли 0,5 мл уксусной кислоты, катализатор отфильтровывали, раствор упаривали и остаток пересаждали из метанола эфиром.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Щукина Л. А., Равдель Г. А., Филатова М. П. (1966) Химия природн. соедин., 265–271.
2. Ravdel G. A., Filatova M. P., Shchukina L. A., Paskhina T. S., Surovikina M. S., Trapeznikova S. S., Egorova T. P. (1967) J. Med. Chem., 10, 242–246.
3. Попкова Г. А., Астапова М. В., Лисункин Ю. И., Равдель Г. А., Крит Н. А. (1976) Биоорган. химия, 2, 1606–1612.
4. Reissmann S., Paegelov I., Leisner H., Arold H. (1975) Experientia, 31, 1395–1396.
5. Bodanszky M., Sheehan J. T., Ondetti M. A., Lande S. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 991–997.
6. Schröder E. (1964) Lieb. Ann. Chem., 673, 186–195.
7. Quitt P., Hellerbach J., Vogler K. (1963) Helv. chim. acta, 46, 327–333.
8. Hamilton P. B., Ortiz P. J. (1955) Biochem. Preparations, 4, 76–79.
9. König W., Geiger R. (1972) in: Chemistry and Biology of Peptides (J. Meienhofer, ed.), pp. 343–350, Ann Arbor Science Publ., Inc., Michigan; König W., Geiger R. (1973) Chem. Ber., 106, 3626–3635.
10. Klausner J. S., Chorev M. (1975) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 973.
11. Филатова М. П., Крит Н. А., Сучкова Г. С., Равдель Г. А., Иванов В. Т. (1975) Биоорган. химия, 1, 437–446.
12. Иванов В. Т., Филатова М. П., Рейссманн Э., Реутова Т. О., Чехляева Н. М. (1977) Биоорган. химия, 3, 1157–1168.
13. Filatova M. P., Reissmann S., Ravdel G. A., Ivanov V. T., Grigoryan G. L., Shapiro A. B. (1973) in: Peptides 1972 (H. Hanson, H. D. Jakubke, eds), pp. 333–340, N.-Holland Publ. Comp. Amsterdam.
14. Goodman M., Stueben K. C. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 1279–1283.
15. Clayton D. W., Farrington J. A., Kenner G. W., Turner J. M. (1957) J. Chem. Soc., 1398–1407.
16. Щукина Л. А., Равдель Г. А., Филатова М. П., Семкин Е. П., Краснова С. Н. (1966) Химия природн. соедин., 124–130.

Поступила в редакцию  
2.III.1979

#### SYNTHESIS OF NEW BRADYKININ ANALOGS WITH MODIFIED PEPTIDE CHAIN

FILATOVA M. P., KRIT N. A., BESCHASTNAYA N. V., REISSMANN S.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical  
Sciences of the USSR, Moscow; F. Schiller University, Iena, DDR*

The synthesis of bradykinin analogs, [Gly<sup>6</sup>, MeArg<sup>9</sup>]bradykinin and [Gly<sup>6</sup>, HyArg<sup>9</sup>]bradykinin, was carried out via stepwise acylation of free N<sup>α</sup>-methylarginine or argininic acid with active esters of appropriate protected amino acids or peptides. Acylation of N<sup>α</sup>-methylamino or hydroxy groups was studied using model compounds bearing unprotected guanidino function. The optimal procedure for acylating N-methylarginine and argininic acid was found to involve N-acylamino acid *p*-nitrophenyl esters in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. The biological activity of the obtained analogs was assayed and their spatial structure was characterized by CD spectra.