



УДК 547.964.4.057:577.175.852'17

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ  
АНАЛОГОВ АНГИОТЕНЗИНА

*Бисенице Д. А., Анцанс Ю. Е., Мышлякова Н. В.,  
Кублик Г. Г., Порункевич Е. А., Раткевич М. И.,  
Чипенс Г. И.*

*Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Синтезированы пять новых аналогов ангиотензина (АТ): [Lys<sup>1</sup>, cyclo(8→1<sup>e</sup>)]АТ (I), [Lys<sup>1</sup>, His(Bzl)<sup>6</sup>, cyclo(8→1<sup>e</sup>)]АТ (II), [(Lys-Asp)<sup>1</sup>, cyclo(8→1<sup>e</sup>)]АТ (III), [(Lys-Asn)<sup>1</sup>, cyclo(8→1<sup>e</sup>)]АТ (IV), [des-Asp<sup>1</sup>, (Phe-Lys)<sup>8</sup>]АТ (V) и исследованы их биологические свойства. Циклизацию с образованием амидной связи проводили с помощью дифенилфосфорилзида или пентафторфениловых эфиров. Циклические аналоги ангиотензина (I, II и IV) в отличие от природного гормона не обладают прессорным действием, но проявляют несвойственный для ангиотензина длительный депрессорный эффект. Слабым прессорным эффектом обладает лишь соединение (III). Все циклические аналоги ангиотензина высвобождают гистамин из перитонеальных тучных клеток крыс.

Тканевый гормон ангиотензин, линейный октапептид, является одним из наиболее изученных низкомолекулярных вазопрессорных агентов. Полагают, что при осуществлении биологических эффектов молекула гормона имеет определенную конформацию, притом, вероятно, различную для отдельных стадий лиганд-рецепторного взаимодействия. Нами установлено, что одним из факторов стабилизации конформации пептидных гормонов являются внутримолекулярные ионные и водородные связи, приводящие во многих случаях к квазициклизации молекулы пептидного биорегулятора [1]. Исходя из предположения о структурообразующей роли С-концевой карбоксильной группы молекулы, мы синтезировали один линейный и четыре циклических аналога ангиотензина (табл. 1). Синтез циклических аналогов ангиотензина (соединения (I)–(IV)) осуществляли классическими методами пептидной химии по общему плану (схемы 1–3): пентапептид (соединение (VIII)) азидным методом конденсировали с дипептидом  $\text{H-Phe-}^{\overline{1}}\text{Lys-OH}$  (VII) и затем методом смешанных ангидридов и активированных эфиров соответственно последовательно присоединяли Вос-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH, Вос-Asn-ONp или Вос-Asp(OBzl)-OPfr. Циклизацию осуществляли с помощью дифенилфосфорилзида или пентафторфениловых эфиров. После циклизации все защитные группы удаляли каталитическим гидрогенолизом. Скорость гидрогенолиза бензильной защитной группы остатка гистидина по ходу реакции существенно снижалась. Полное отщепление бензильной группы достигалось лишь при длительном гидрогенолизе и периодической смене катализатора. Однако в случае гидрогенолиза соединения (XIV) бензильную группу в этих условиях удалось отщепить только частично. Обращенно-фазовой хроматографией реакционной смеси (рис. 1) выделяли целевой продукт (I) и его аналог, содержащий бензильную группу на остатке гистидина (соединение (II)).

Биологические исследования синтезированных циклических аналогов ангиотензина привели к весьма неожиданным результатам. Циклические аналоги ангиотензина, за исключением соединения (III), при внутривен-

Сокращения: АТ – ангиотензин, ВП – вазопрессин, DCC – N,N'-дихлорогексилкарбодимид, НОВТ – 1-оксibenзотриазол, DMF – диметилформамид, THF – тетрагидрофуран, СМ-целлюлоза – карбоксиметилцеллюлоза, ONp – *n*-нитрофенокси, OPfr – пентафторфенокси, комплекс «F» – 1 моль DCC и 3 моль пентафторфенола.

Схема 1

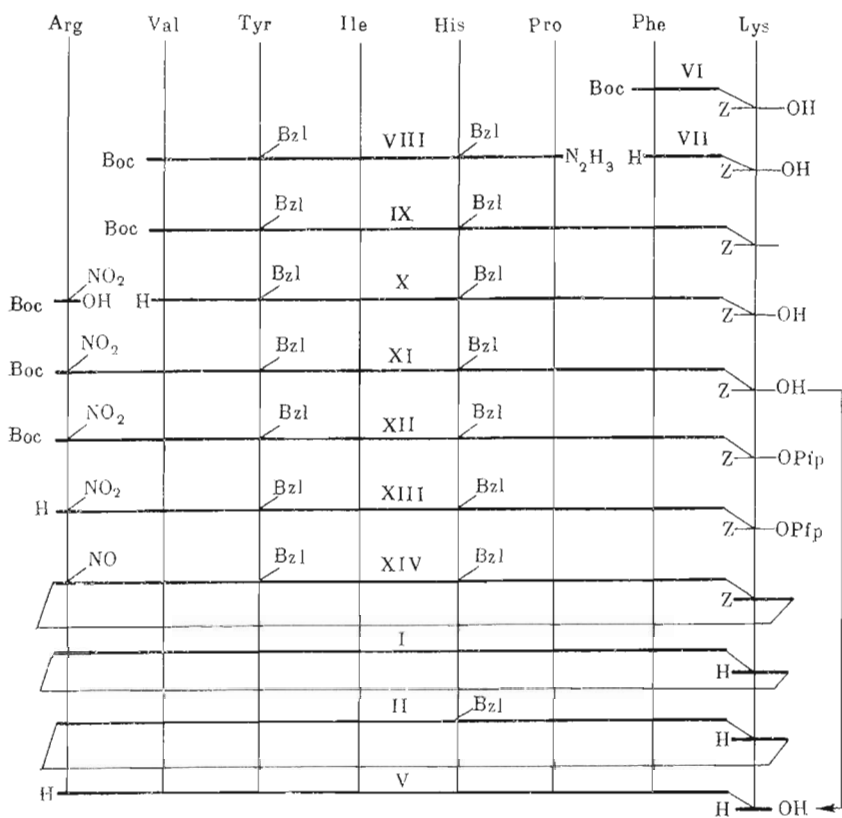
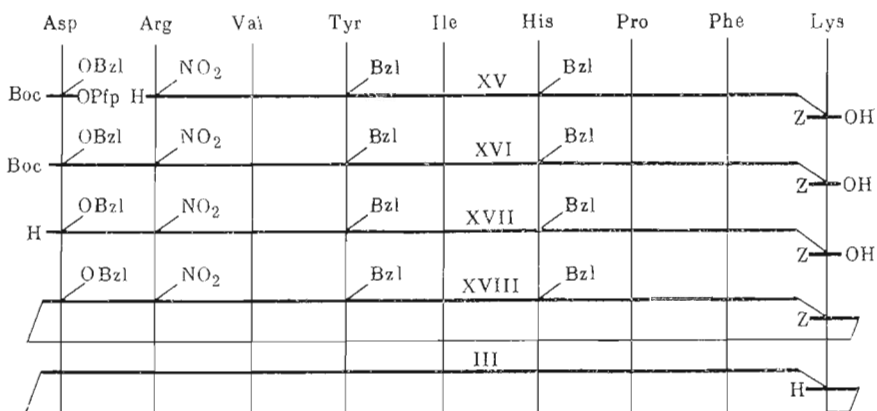
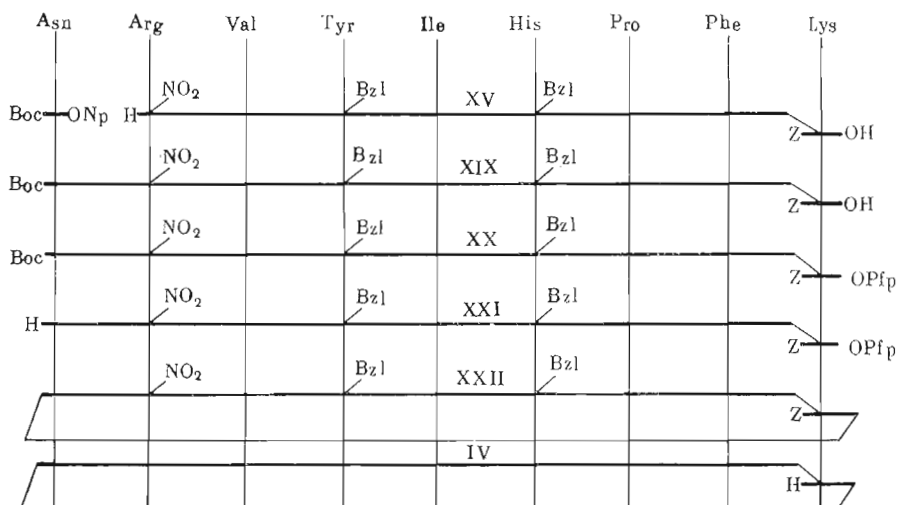


Схема 2



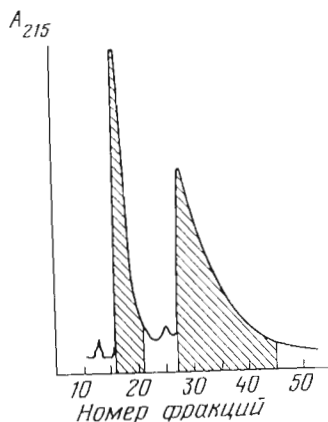
ном введении проявляют выраженное депрессорное действие (табл. 1). В случае соединений (I) и (II) понижение артериального давления крыс достигает 25–35 мм рт. ст., а длительность эффекта — от нескольких минут при пороговой дозе (50 мкг/кг) до 2 ч и более при эффективной дозе (500 мкг/кг). Соединение (IV) менее активно: пороговая доза составляет ~120 мкг/кг, а продолжительность депрессорного состояния при дозе 500 мкг/кг не превышает 30 мин (табл. 2). Соединения (I) и (II) при эффективных дозах в течение 20–40 мин (а соединение (IV) — в течение 10–15 мин) уменьшают прессорный эффект как ангиотензина (рис. 2а), так и вазопрессина (рис. 2б). Это свидетельствует о неспецифическом (функциональном) механизме ингибирования прессорного эффекта этих гормонов.



Соединение (III), которое отличается от остальных циклоаналогов ангиотензина, проявляющих депрессорный эффект, наличием остатка аспарагиновой кислоты, обладает слабовыраженным прессорным и миотропным действием. В дозе 500 мкг/кг соединение (III) проявляет такой же прессорный эффект, как ангиотензин в дозе 0,5 мкг/кг, т. е. оно обладает 0,1% прессорного эффекта ангиотензина. Однако на прессорный и миотропный эффекты соединения (III) не влияет специфический блокатор рецепторов ангиотензина — саралазин. Соединение (III) не влияет на прессорные и миотропные эффекты природного гормона. В ряду линейных аналогов ангиотензина остатки аспарагина-1 и аспарагиновой кислоты-1 эквивалентны: замена аспарагиновой кислоты на аспаргин не влияет на спектр биологических эффектов ангиотензина [2, 3]. Однако в случае циклоаналогов ангиотензина наличие β-карбоксовой группы аспарагиновой кислоты приводит к потере депрессорной активности. Это позволяет предполагать определенную кислотность мест связывания циклических аналогов ангиотензина, обладающих депрессорным действием на поверхности тканей-мишеней. Миотропная активность синтезированных соединений в опытах на изолированной colon ascendens крысы выражена слабо (соединения (I), (III)) или практически отсутствует (соединения (II), (IV), (V)); кумулятивные кривые «концентрация — эффект» пологие и не параллельны таковой для ангиотензина (рис. 3).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что циклические аналоги ангиотензина независимо от их эффектов на артериальное давление (депрессорное или прессорное действие) не взаимодействуют

Рис. 1. Разделение соединений (I) и (II) препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке (0,46×25 см) Zorbax ODS. Элюент — CH<sub>3</sub>CN, 0,1 M NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO (1:1), объем фракций 10 мл, скорость элюции 2,5 мл/мин. Фракции 16–22 — соединение (I), фракции 27–45 — соединение (II)



Первичная структура и биологические свойства синтезированных соединений

Соединение	Первичная структура	Влияние на артериальное давление	Высвобождение гистамина, $EC_{50}$ %, моль/л	Надпочечники крыс		
				Относительное сродство связывания (С)	Стимуляция синтеза альдостерона, $EC_{50}$ , моль/л	Внутренняя активность, $\alpha$
I	Lys-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	Депрессорное	$5,66 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-8}$	1
II	Lys-Arg-Val-Tyr-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe	»	$3,89 \cdot 10^{-7}$	0 **	n/a	n/a
III	Lys-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	Прессорное, 0,1%	$2,86 \cdot 10^{-5}$	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$	0,9
IV	Lys-Asn-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	Депрессорное	$2,01 \cdot 10^{-6}$	$8,7 \cdot 10^{-5}$	$9,4 \cdot 10^{-7}$	1,0
V	Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	Не влияет	$6,16 \cdot 10^{-5}$	$4,3 \cdot 10^{-4}$	n/o	n/o
	Asn-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe(AT)	Прессорное, 100%	n/a	1,0	$6,2 \cdot 10^{-11}$	1

\*  $EC_{50}$  — концентрация пептида, при которой проявляется 50% биоэффекта; n/a — не активен; n/o — не определено;  $\alpha$  — отношение максимального количества альдостерона, образовавшегося под действием исследуемого соединения, к максимальному количеству альдостерона, образовавшегося под действием ангиотензина.

\*\* Не конкурирует с [121-Tyr]AT за связывание до концентрации  $10^{-3}$  M.

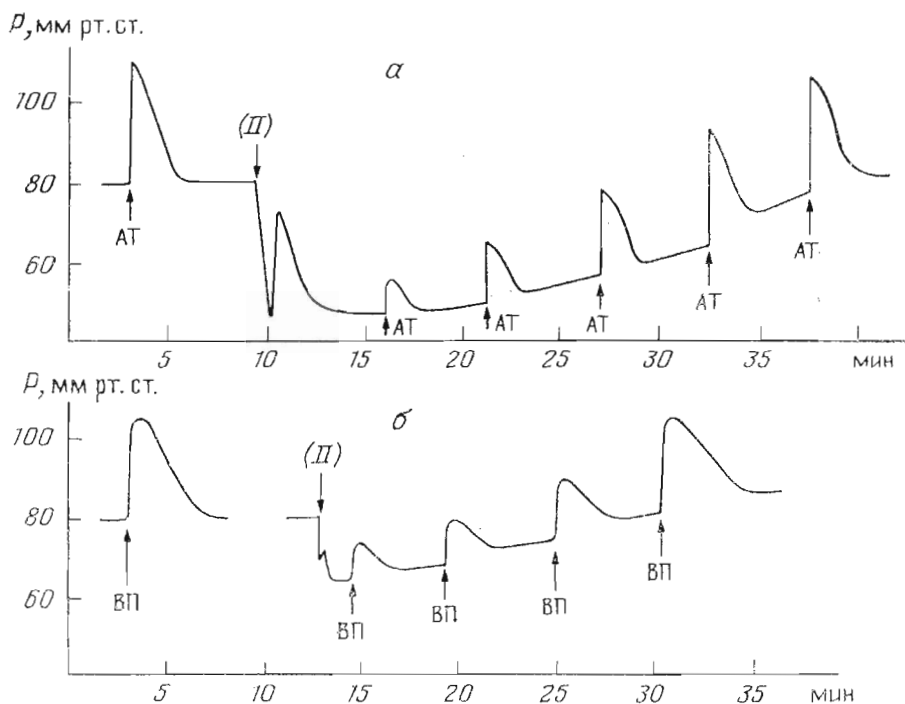


Рис. 2. Схематическое изображение влияния соединения (II) в дозах 500 (а) и 5 мкг/кг (б) на прессорные эффекты ангиотензина (2,5 мкг/кг) и вазопрессина (0,1 МЕ/мл) в опытах на паротомизированных крысах. P — артериальное давление

со специфическими рецепторами ангиотензина в гладкой мускулатуре. В пользу этого также говорят результаты исследования аналога ангиотензина с блокированной имидазольной функцией остатка гистидина. В случае природного гормона или его линейных аналогов такое блокирование приводит к практически полной потере биологической активности [4], в то время как в случае циклического аналога (II) наличие бензильной защитной группы на имидазольной функции остатка гистидина практически не влияет на депрессорный эффект (табл. 2). Исследования взаимодействия циклических аналогов с рецепторами ангиотензина в изолированных клетках коры надпочечников показало, что сродство аналогов к рецепторам снижено (на 3–4 порядка) (табл. 1). Вид кривых концентрация — эффект и сохранение полной внутренней активности у соединений ( $\alpha=0,9-1,0$ ) указывает на специфичность их взаимодействия с рецепторами ангиотензина в надпочечниках. Это подтверждает также тот факт, что блокирование функционально важного имидазольного кольца

Таблица 2

Величина и длительность депрессорного эффекта аналогов АТ в зависимости от введенной дозы

Соединение	Доза, мкг/кг	Понижение артериального давления, мм рт. ст.	Длительность эффекта, мин
I	50	15	1,5
	500	27	>120
II	50	23	3,0
	500	35	>120
IV	50	0	—
	500	25	25
	1000	32	>120

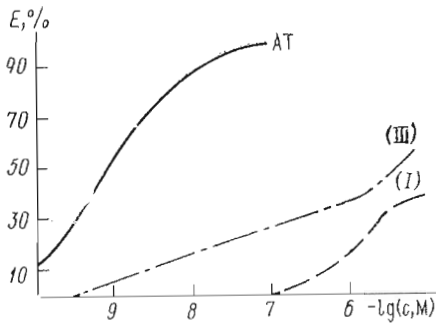


Рис. 3

Рис. 3. Кумулятивные кривые концентрация – эффект ангиотензина и его циклических аналогов (I) и (III) в опытах *in vitro* на изолированной ободочной кишке крысы.  $E$  – миотропный эффект, %

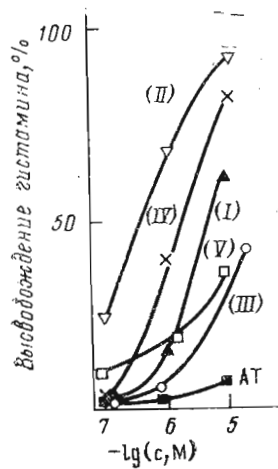


Рис. 4

Рис. 4. Влияние ангиотензина и его аналогов на высвобождение гистамина из перитонеальных тучных клеток крысы

(соединение (II)) приводит к полной потере способности стимулировать биосинтез альдостерона в надпочечниках (табл. 1).

Сопоставление биологических эффектов циклоаналогов ангиотензина с эффектами природных кининов (вещество P [5, 6], нейротензин [7] и его аналоги [8]), обладающих депрессорными свойствами, показало, что депрессорный эффект циклоаналогов ангиотензина при внутривенном введении, как и в случае вышеуказанных кининов, можно разделить на три характерные фазы: немедленного, резкого понижения артериального давления крысы, кратковременной тенденции на повышение и последующего длительного депрессорного состояния (рис. 2). Вторая фаза действия, тенденция повышения давления, тем меньше выражена, чем выше депрессорная активность соединения.

Согласно литературным данным, определенную роль в проявлении депрессорного эффекта кининов играет гистамин, секретированный клетками-депо [7, 9, 10]. С целью установления возможной роли гистамина в проявлении депрессорного эффекта циклоаналогов ангиотензина мы исследовали их влияние на высвобождение гистамина перитонеальными тучными клетками крысы в опытах *in vitro* (табл. 1, рис. 4). Исследования показали, что циклоаналоги ангиотензина, обладающие депрессорным действием, также являются гистаминвысвобождающими агентами. Гистамин из тучных клеток высвобождается также линейным соединением (V), которое не влияет на артериальное давление крысы, и соединением (III), обладающим прессорным действием. В последних двух случаях (соединения (III) и (V)) гистаминвысвобождающая активность ниже, чем в случае соединений, проявляющих депрессорное действие, однако различия не столь явно выражены, чтобы можно было сделать определенные выводы о роли гистамина в биологических эффектах циклических аналогов ангиотензина.

Суммируя сказанное, необходимо подчеркнуть, что проведенные модификации молекулы ангиотензина (циклизация или блокирование функциональных групп аминокислотных остатков) не в одинаковой мере влияют на различные биологические функции природного гормона, что указывает на различную организацию рецепторных систем ангиотензина в различных тканях-мишенях.

Таким образом, результаты биологических исследований циклоаналогов ангиотензина показывают, что эти соединения не взаимодействуют со специфическими рецепторами ангиотензина в гладкой мускулатуре. Средство циклоаналогов к рецепторам гормона и в других тканях-мишенях крайне снижено. Описанные в литературе циклические аналоги

ангиотензина также либо обладают низкой специфической активностью, либо являются неактивными соединениями [11–15], однако о депрессорном действии аналогов ангиотензина никаких данных до настоящего времени не опубликовано. На основании результатов биологических исследований можно сделать предположение, что одним из признаков, определяющих депрессорное действие аналогов ангиотензина, является цикличность их структуры.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для синтеза использовали *L*-аминокислоты и их производные фирмы Reanal (Венгрия).

Температуру плавления всех соединений определяли в открытых капиллярах (приведена без исправления). Удельное оптическое вращение измеряли на цифровом поляриметре Perkin – Elmer 141 (США).

Электрофорез проводили на бумаге FN-16 (ГДР) в 5 М уксусной кислоте (рН 4.9) при градиенте потенциала 18 В/см, электрофоретическая подвижность соединений приведена по отношению к гистидину ( $E_{\text{HIS}}$ ). ТСХ осуществляли на пластинках DC-Fertigplatten Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ) в следующих системах: хлороформ – этанол – этилацетат – уксусная кислота – вода, 85:5:8:2:0,25 (А); этилацетат – пиридин – уксусная кислота – вода, 5:3:1:2 (Б); хлороформ – метанол – уксусная кислота – вода, 120:41:6:6 (В); хлороформ – метанол – уксусная кислота, 85:10:5 (Г); хлороформ – этанол – *n*-бутанол – этилацетат – вода, 10:6:4:3:1 (Д); этилацетат – *n*-бутанол – уксусная кислота – вода, 2:1:1:1 (Б); хлороформ – этанол – уксусная кислота, 240:4:1 (Ж); хлороформ – метанол – этилацетат – вода, 8:6:4:1 (З); система А – изопропанол, 4:1 (И); пиридин – *n*-бутанол – уксусная кислота – вода, 10:15:3:12 (К); *n*-бутанол – пиридин – уксусная кислота – вода, 4:1:1:2 (Л); *n*-бутанол – пиридин – уксусная кислота – вода, 42:24:4:35 (М). Вещества обнаруживали в УФ-свете, нингидрином, реактивами Сакагучи, Бартона, Паули и хлорбензидином.

Препаративную ионообменную хроматографию проводили на СМ-целлюлозе Whatman CM-32, вещества детектировали при помощи приборов Uvicord III (LKB, Швеция) при 206 и 254 нм. Для создания градиента использовали прибор Ultrograd той же фирмы. Препаративную адсорбционную хроматографию осуществляли на хроматографе Chromatospak Per 10 (Jobin Yvon, Франция) с силикагелем П 60 (Merck, ФРГ). Элюат контролировали в проточном абсорбиметре Uvicord II фирмы LKB при 280 нм. Препаративную и аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на хроматографе Du Pont 830 (колонок Zorbax C<sub>8</sub>). Аминокислотный анализ гидролизатов пептидов выполняли на анализаторе Liquimat III (США) после 24-часового гидролиза в 6 н. НСl в запаянной ампуле при 110°С. Данные аминокислотного анализа приведены без учета разложения аминокислот. Молекулярную массу синтезированных соединений определяли на приборе Varian MAT CH-5DF с приставкой EI-FI-FD (США).

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР соединений (I) и (II) в D<sub>2</sub>O, рН 2,0, при 20°С получали на приборе WM-360 (Bruker, ФРГ); химические сдвиги (в миллионных долях) определены относительно внутреннего стандарта 2,2-диметил-2-симлапентан-5-сульфокислоты. Отнесение резонансных сигналов к аминокислотным остаткам проведено на основе двухмерного корреляционного спектра.

Легколетучие растворители упаривали на ротационном испарителе в вакууме водоструйного насоса, а DMF – при 0,5–1,0 мм рт. ст. Температура бани во всех случаях не превышала 35°С. Вещества высушивали в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH и серной кислотой.

Биологическую активность синтезированных аналогов ангиотензина исследовали в опытах *in vivo* и *in vitro*; в качестве стандартного препарата использовали ангиотензин отечественного производства. В опытах *in vivo* определяли влияние синтезированных соединений на артериальное давление крыс. Эксперименты проводили на белых крысах обоего пола массой 180–200 г, наркотизированных 2,5% раствором уретана из расчета 0,5 мл на 100 г веса. Вещество вводили в бедренную вену в виде инъекций в объеме 0,1 мл/200 г в дозах 0,5–1000 мкг/кг. Влияние соединений (I)–(V) на прессорный эффект ангиотензина изучали путем их введения в дозах 0,5–1000 мкг/кг за 1 мин до введения ангиотензина.

Артериальное давление регистрировали из общей сонной артерии при помощи датчика давления Bentley Grantec Pressure Transducer на 2-канальном регистрирующем приборе Gemini (Италия). Миотропную активность изучали в опытах *in vitro* по описанной методике посредством регистрации изотонических сокращений восходящей ободочной кишки (colon ascendens) крыс [16]. Конкурентное связывание пептидов с рецепторами изолированных клубочковых клеток надпочечников крыс и влияние их на биосинтез альдостерона в клубочковых клетках исследо-

вали как описано в литературе [17]. Влияние пептидов на высвобождение гистамина из перитонеальных тучных клеток крыс определяли по методу [18] с некоторыми модификациями. Содержание гистамина определяли флуориметрическим методом [19].

*Woc-Phe*- $\overline{\text{Z-Lys-OH}}$  (VI). К суспензии 4,2 г (15 ммоль) *Z-Lys-OH* в 30 мл DMF добавляли раствор 5,8 г (15 ммоль) *Woc-Phe-ONp* в 15 мл DMF. Перемешивали 48 ч при 20°С. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали последовательно 5% раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, 10% раствором  $\text{KHSO}_4$ , водой. Органическую фазу высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали. Остаток растворяли в 30 мл эфира, добавляли 200 мл гексана и выдерживали 48 ч при 4°С. Осадок отфильтровывали и на фильтре промывали гексаном. Выход 7 г (88,5%). Т. пл. 65–68°С;  $[\alpha]_D^{20} +8^\circ$  (с1, DMF);  $R_f$  0,43 (А);  $E_{\text{HIS}}$  0,13.

*HCl-H-Phe*- $\overline{\text{Z-Lys-OH}}$  (VII). К раствору 6,8 г (13 ммоль) соединения (VI) в 30 мл этилацетата добавляли 13 мл (52 ммоль) 4 М HCl в этилацетате. Перемешивали 20 мин при 20°С и упаривали. К остатку добавляли 10 мл метанола и снова упаривали. Остаток промывали эфиром, отфильтровывали и высушивали. Выход 5,8 г (97%). Т. пл. 59–61°С;  $[\alpha]_D^{20} -13^\circ$  (с1, DMF);  $R_f$  0,47 (Б), 0,26 (В);  $E_{\text{HIS}}$  0,6.

*Woc-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe*- $\overline{\text{Z-Lys-OH}}$  (IX). К охлажденному до –20°С раствору 3,0 г (3,25 ммоль) соединения (VIII) [20] в 30 мл DMF добавляли 3,25 мл (13 ммоль) 4 М HCl в этилацетате и 0,38 мл (3,25 ммоль) *трет*-бутилитрита в 2 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при –20°С, 10 мин при –5°С, охлаждали до –40°С и добавляли охлажденный до –10°С раствор 1,8 мл (13 ммоль) триэтиламина в 3 мл DMF и при –20°С добавляли охлажденный до –5°С раствор, содержащий 1,51 г (3,25 ммоль) соединения (VII) и 0,45 мл (3,25 ммоль) триэтиламина в 5 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при –5°С, выдерживали 24 ч при 4°С и выливали в 1 л 50% раствора NaCl. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали водой. Выход 3,5 г (81,6%). Т. пл. 127–130°С;  $[\alpha]_D^{20} -36^\circ$  (с1, DMF);  $R_f$  0,57 (Г), 0,82 (В).

$2\text{HCl-H-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe}$ - $\overline{\text{Z-Lys-OH}}$  (X). К раствору 3,4 г (2,6 ммоль) соединения (IX) в уксусной кислоте добавляли 2,6 мл (10,4 ммоль) 4 М HCl в уксусной кислоте. Перемешивали 20 мин при 20°С, упаривали, к остатку добавляли 50 мл метанола, снова упаривали и остаток промывали эфиром. Выход 3,3 г (99%). Т. пл. 155–158°С;  $[\alpha]_D^{20} -20^\circ$  (с 0,5, DMF);  $R_f$  0,46 (Д), 0,68 (Е);  $E_{\text{HIS}}$  0,59.

*Woc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe*- $\overline{\text{Z-Lys-OH}}$  (XI). К охлажденному до –5°С раствору 0,83 г (2,64 ммоль) *Woc-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH*· $\frac{3}{4}$ THF в 3 мл DMF при перемешивании добавляли 0,45 мл (2,64 ммоль) *N,N*-диизопропилэтиламина и 0,26 мл (2,64 ммоль) этилового эфира хлоругольной кислоты. Перемешивали 30 мин при –5°С и добавляли охлажденный до –5°С раствор 3,36 г (2,6 ммоль) соединения (X) и 0,44 мл (2,6 ммоль) *N,N*-диизопропилэтиламина в 10 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 15 ч при 20°С и выливали в 200 мл воды. Осадок отфильтровывали, высушивали и очищали хроматографией на силикагеле в системе Ж. Выход 1,73 г (43,7%). Т. пл. 127–130°С;  $[\alpha]_D^{20} -34^\circ$  (с1, DMF);  $R_f$  0,35 (Г), 0,71 (З).

*Woc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe*- $\overline{\text{Z-Lys-OPfp}}$  (XII). К раствору 1,52 г (1 ммоль) соединения (XI) в 30 мл диоксана добавляли раствор 1,14 г (1,5 ммоль) комплекса «F» в 5 мл диоксана. Перемешивали 48 ч при 20°С, осадок дициклогексимочевини отфильтровывали, фильтрат упаривали и остаток промывали эфиром. Выход 1,5 г (89,2%),  $R_f$  0,8 (Г), 0,6 (З), 0,82 (В).



$2\text{HCl} \cdot \text{H-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Val-Tyr}(\text{Bzl})\text{-Ile-His}(\text{Bzl})\text{-Pro-Phe-}\overline{\text{Z-Lys-OPfp}}$  (XIII). К раствору 1,5 г (0,89 ммоль) соединения (XII) в уксусной кислоте добавляли 0,9 мл 4 М HCl в уксусной кислоте. Перемешивали 20 мин при 20° С, упаривали и остаток промывали эфиром. Выход 1,38 г (93,9%);  $R_f$  0,22 (З), 0,72 (Г), 0,7 (В).

$\text{cyclo}[\text{Z-Lys-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Val-Tyr}(\text{Bzl})\text{-Ile-His}(\text{Bzl})\text{-Pro-Phe-}]$  (XIV). К охлажденному до 15° С диоксану добавляли 0,57 мл (3,3 ммоль) N,N-диизо-пропилэтиламина и раствор 1,38 г (0,83 ммоль) соединения (XIII) в 20 мл DMF. Перемешивали 24 ч при 20° С, упаривали и остаток промывали раствором  $\text{KHSO}_4$  (рН 5). Осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Вещество растворяли в 200 мл хлороформа и наносили на хроматографическую колонку с силикагелем, элюировали системой И. Выход 0,5 г (43,1%),  $R_f$  0,43 (И), 0,54 (З), 0,8 (В).

$\text{cyclo}(\text{Lys-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-})$  (I) и  $\text{cyclo}(\text{Lys-Arg-Val-Tyr-Ile-His}(\text{Bzl})\text{-Pro-Phe-})$  (II). 0,5 г (0,36 ммоль) соединения (XIV) суспендировали в 100 мл смеси метанол—уксусная кислота—вода (6:1:1), прибавляли 0,2 г Pd-черни и гидрировали в токе водорода 35 ч, добавляя по 0,1 г свежей Pd-черни через 15 и 25 ч. Катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали и полученную смесь предварительно очищали ионообменной хроматографией на СМ-целлюлозе. Элюцию проводили в градиенте ацетата аммония; 0,01 М, рН 4,5 → 0,25 М, рН 6,7 (выход соединений (I) и (II) одновременный). Разделение соединений (I) и (II) осуществляли обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 1). Для соединения (I): выход 0,105 г (24%);  $[\alpha]_D^{20}$   $-32^\circ$  (с 0,1; 1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ );  $R_f$  0,26 (Б), 0,62 (К), 0,31 (Е);  $E_{\text{His}}$  0,73. Аминокислотный состав: Lys 1,01 (1), Arg 0,91 (1), Val 1,11 (1), Tyr 0,83 (1), Ile 0,97 (1), His 1,07 (1), Pro 0,78 (1), Phe 0,90 (1).  $^1\text{H-ЯМР-спектр}$  ( $\delta$ , м.д.): 8,63, с, 1H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{His}$ , *цис*); 8,60, с, 1H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{His}$ , *транс*); 7,37—7,16, м, 6H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{His}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5$  Phe); 7,08, д, 2H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{Tyr}$ ); 6,85, д, 2H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{Tyr}$ , *транс*); 6,78, д, 2H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{Tyr}$ , *цис*). Содержание *цис*-изомера 25–30%.

Для соединения (II): выход 0,166 г (33%);  $[\alpha]_D^{20}$   $-6,7^\circ$  (с 0,1; 1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ );  $R_f$  0,4 (Б), 0,54 (К), 0,42 (Е);  $E_{\text{His}}$  0,85. Молекулярная масса (определяли методом полевой десорбции) 1130; вычислено для  $\text{C}_{59}\text{H}_{82}\text{N}_{14}\text{O}_9$  — 1131,401. Аминокислотный анализ: Lys 1,03 (1), Arg 0,88 (1), Val 1,0 (1), Tyr 0,97 (1), Ile 0,94 (1), Phe 0,94 (1), Phe 1,05 (1), His 0,03 (в данных условиях гидролиза His(Bzl) не гидролизуются).  $^1\text{H-ЯМР}$  ( $\delta$ , м.д.): 8,83, с, 1H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{His}$ , *цис*); 8,80, с, 1H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{His}$ , *транс*); 7,45, м, 5H ( $\text{C}_6\text{H}_5$  Bzl); 7,37—7,17, м, 6H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{His}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5$  Phe); 7,10, д, 2H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{Tyr}$ ); 6,87, д, 2H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{Tyr}$ , *транс*); 6,80, д, 2H ( $\text{C}^{\text{H}}\text{Tyr}$ , *цис*); 5,38, кв, 2H ( $\text{CH}_2$  Bzl, *транс*); 5,35, с, 2H ( $\text{CH}_2$  Bzl, *цис*). Содержание *цис*-изомера 25%.

$\text{H-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-}\overline{\text{H-Lys-OH}}$  (V) получали из 0,2 г (0,13 ммоль) соединения (XI) аналогично соединению (I). Целевой продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ, колонка Zorbax ODS (0,46×25 см), элюент — 40%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 60% 0,2 М  $\text{AcONH}_4$ . Выход 0,056 г (40,3%).  $R_f$  0,76 (Б), 0,5 (К);  $E_{\text{His}}$  0,8.

$2\text{HCl} \cdot \text{H-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Val-Tyr}(\text{Bzl})\text{-Ile-His}(\text{Bzl})\text{-Pro-Phe-}\overline{\text{Z-Lys-OH}}$  (XV) получали из 2,6 г (1,05 ммоль) соединения (XI) аналогично соединению (X). Выход 1,54 г (98,5%). Т. пл. 120–123° С.  $[\alpha]_D^{20}$   $-28,9^\circ$  (с 1, DMF);  $R_f$  0,75 (Е), 0,46 (З), 0,52 (В).

$\text{Boc-Asp}(\text{OBzl})\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Val-Tyr}(\text{Bzl})\text{-Ile-His}(\text{Bzl})\text{-Pro-Phe-}\overline{\text{Z-Lys-OH}}$  (XVI). К раствору 1,75 г (1,2 ммоль) соединения (XV) в 5 мл DMF добавляли при 0° С 0,21 мл (1,2 ммоль) N,N-диизо-пропилэтиламина и раствор 0,64 г (1,3 ммоль) Boc-Asp(OBzl)-OPfp в 2 мл DMF. Перемешивали 24 ч при 20° С. Реакционную смесь выливали в 100 мл 100% раствора  $\text{KHSO}_4$ , осадок отфильтровывали, промывали водой, высушивали. Продукт растворяли в этаноле и осаждали эфиром, выпавший осадок от-

фильтровывали и промывали эфиром. Выход 1,7 г (84,2%). Т. пл. 120–123° С;  $[\alpha]_D^{20}$  –33,5° (с1, DMF);  $R_f$  0,78 (З), 0,37 (Г).

*2HCl·H-Asp(OBzl)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe-Z-Lys-OH* (XVII) получали из 1,6 г (0,93 ммоль) соединения (XVI) аналогично соединению (X). Выход 1,54 г (98,1%). Т. пл. 127–130° С;  $[\alpha]_D^{20}$  –28,4° (с1, DMF);  $R_f$  0,13 (Г), 0,6 (З).

*cyclo(Z-Lys-Asp(OBzl)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe-)* (XVIII). К охлажденному до 0° С раствору 0,6 г (0,35 ммоль) соединения (XVII) в 600 мл DMF добавляли 0,12 мл (0,7 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина. Реакционную смесь охлаждали до –25° С и добавляли 0,11 мл (0,47 ммоль) дифенилфосфорилазида. Раствор выдерживали 48 ч при –25° С, 48 ч при 2° С и 72 ч при 20° С. Упаривали до 1/3 объема и выливали в 50 мл 10% раствора KHSO<sub>4</sub>. Выпавший осадок отфильтровывали, на фильтре промывали водой. Продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ, колонка Zorbax ODS (0,46×25 см), элюент – 45% CH<sub>3</sub>CN, 55% 0,2 М AcONH<sub>4</sub>. Выход 0,15 г (25,4%),  $R_f$  0,58 (А).

*cyclo(H-Lys-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-)* (III) получали из 0,14 г (0,08 ммоль) соединения (XVIII) аналогично соединению (I). Продукт после упаривания растворяли в этаноле и осаждали эфиром, осадок отфильтровывали и промывали этилацетатом. Выход 0,046 г (42%).  $[\alpha]_D^{20}$  –58,7° (с 0,3; 1 М CH<sub>3</sub>COOH);  $R_f$  0,3 (Б);  $E_{\text{илс}}$  0,84. Аминокислотный анализ: Lys 1,04 (1), Asp 1,02 (1), Arg 0,89 (1), Val 1,05 (1), Tyr 0,86 (1), Ile 1,0 (1), His 0,95 (1), Pro 1,05 (1), Phe 0,92 (1).

*Woc-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe-Z-Lys-OPfp* (XIX). К охлажденному до 0° С раствору 1,5 г (1 ммоль) соединения (XV) в 5 мл DMF при перемешивании добавляли 0,34 мл (2 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина, 0,39 г (1,1 ммоль) Woc-Asn-ONp и 0,14 г (2 ммоль) имидзола. Перемешивали 48 ч при 20° С. Реакционную смесь выливали в 150 мл 3% раствора KHSO<sub>4</sub>. Осадок отфильтровывали и промывали водой. Продукт растворяли в 3 мл уксусной кислоты, добавляли 200 мл хлороформа и наносили на хроматографическую колонку с силикагелем, элюент – система И. Выход 0,9 г (55%). Т. пл. 122–124° С;  $[\alpha]_D^{20}$  –33° (с1, DMF);  $R_f$  0,58 (З), 0,15 (Г), 0,43 (Д).

*Woc-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe-Z-Lys-OPfp* (XX) получали из 0,4 г (0,25 ммоль) соединения (XIX) и 0,48 г (0,63 ммоль) комплекса «F» аналогично соединению (XII). Выход 0,41 г (93%);  $R_f$  0,24 (И), 0,63 (З).

*2HCl·H-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe-Z-Lys-OPfp* (XXI) получали из 0,4 г (0,22 ммоль) соединения (XX) аналогично соединению (XIII). Выход 0,38 г (94%),  $R_f$  0,4 (В), 0,64 (Е).

*cyclo(Z-Lys-Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Phe-)* (XXII) получали из 0,38 г (0,21 ммоль) соединения (XXI) и 0,14 мл (0,84 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина аналогично соединению (XIV), но реакционную смесь перемешивали 72 ч при 20° С. Продукт очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ, колонка размером 2,12×25 см. Элюент – 40% CH<sub>3</sub>CN, 60% 0,2 М AcONH<sub>4</sub>. Выход 0,11 г (34,4%),  $R_f$  0,55 (Д), 0,14 (Г).

*cyclo(H-Lys-Asn-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-)* (IV) получали из 0,11 г (0,07 ммоль) соединения (XXII) аналогично соединению (XIV). После упаривания остаток промывали эфиром, отфильтровывали. Выход 0,06 г (71%).  $[\alpha]_D^{20}$  –51° (с 0,3; 1 М CH<sub>3</sub>COOH);  $R_f$  0,23 (Б), 0,49 (Л), 0,86 (М);  $E_{\text{илс}}$  0,86. Аминокислотный состав: Lys 0,63 (1), Asn 0,83 (1), Arg 0,74 (1), Val 0,74 (1), Tyr 0,70 (1), Ile 0,75 (1), His 0,54 (1), Pro 0,79 (1), Phe 0,65 (1).

Авторы благодарны И. П. Селевскому за снятие спектров ЯМР и помощь в их интерпретации и В. Д. Григорьевой за очистку пептидов методом ВЭЖХ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Чипенс Г. И. В кн.: Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980, с. 11–124.
2. Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M. In: Angiotensin. Handbook of experimental pharmacology. New ser. XXXVII/Eds Page I. H., Bumpus F. B.—N. Y., 1974, p. 126–161.
3. Kono T., Taniguchi A., Imura H., Oseko F., Khosla M. Life Sci., 1985, v. 37, № 4, p. 365–369.
4. Khosla M. C. J. Med. Chem., 1973, v. 16, № 9, p. 968–970.
5. Bury R. W., Mashford M. L. Austral. J. Exp. Biol. and Med. Sci., 1977, v. 55, p. 671–735.
6. Oehme P., Hilse H., Hecht K., Poppei M., Moritz V., Min Thu, Scheer E. Pharmazie, 1981, v. 36, p. 502–505.
7. Oishi M., Inagaki C., Takaori S. Neuropeptides, 1984, v. 4, № 5, p. 351–359.
8. Quirion R., Rioux F., St-Pierre S., Belanger F., Jolicoeur F. B., Barbeau A. Neuropeptides, 1981, v. 1, № 1, p. 253–259.
9. Kérouac R., Fournier A., Barabe J., St-Pierre S., Rioux F. Neuropeptides, 1983, v. 3, № 4, p. 285–293.
10. Kérouac R., St-Pierre S., Rioux F. Peptides, 1984, v. 5, № 4, p. 695–699.
11. De Coen J., Ralston E., Durieux J., Loffet A. In: Peptides: chemistry, structure and biology/Eds Walter R., Meienhofer J. N. Y.: Ann Arbor Sci., 1975, p. 553–558.
12. Вегнер Р. Э., Чипенс Г. И., Гриншвейне И. В., Мышлякова Н. В., Афанасьева Г. А., Воекална И. А. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 325–335.
13. Matsukkas J. H., Scanlon M. N., Moore G. J. J. Med. Chem., 1984, v. 27, № 3, p. 404–406.
14. Chipens G., Nikiforovich G., Mutulis F., Veretennikova N., Vosekalna I., Sosnov A., Polevaya L., Ancans J., Mistryakova N., Liepinsh E., Sekacis I., Breslav M. In: Peptides: structure and biological function/Eds Gross E., Meienhofer J. Rockford: Pierce Chemical Co., 1980, p. 567–570.
15. Jorgensen E., Patton W. J. Med. Chem., 1969, v. 12, № 5, p. 935–936.
16. Van Rossum J. M. Arch. Int. Pharmacodyn., 1963, v. 143, № 3–4, p. 299–330.
17. Сыков И. В., Кублис Г. Г., Скуйльш А. А., Караев Б. С., Порункевич Е. А., Афанасьева Г. А., Пудане Э. П., Романовский П. Я., Чипенс Г. И. Биохимия, 1983, т. 48, № 3, с. 498–502.
18. Carraway R. E., Cochrane D. E., Granier C., Kitabgi P., Leeman E., Singer E. A. Brit. J. Pharmac., 1984, v. 81, № 2, p. 227–229.
19. May C., Lyman M., Aberto R., Cheng J. J. Allergy, 1970, v. 46, № 1, p. 12–20.
20. А. с. 1067796 (СССР). Циклический аналог ангиотензина, обладающий способностью ингибировать прессорное и миотропное действие ангиотензина/Чипенс Г. И., Анданс Ю. Е., Берга Д. А., Лиепиньш Э. Э., Миспя И. П., Пудане Э. П., Секацис И. П. Заявл. 30.10.1981, № 3349493.—Опубл. в Б. И., 1986, № 2, с. 284.

Поступила в редакцию

12.III.1986

После доработки

4.VI.1986

## SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF CYCLIC ANALOGUES OF ANGIOTENSIN

BISENIECE D., ANCANS J., MYSHLIAKOVA N., KUBLIS G.,  
PORUNKEVICH E., RATKEVICH M., CHIPENS G.

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

Biological properties of five novel angiotensin analogues synthesized, using the conventional methods of peptide chemistry, have been studied. Cyclization was attained by means of amide linkage with the aid of diphenylphosphorylazide or pentafluorophenyl esters. Unlike the natural hormone, the cyclic analogues of angiotensin show no pressor activity, but elicit a depressor effect untypical of angiotensin. A slight pressor activity was exhibited by the compound containing aspartic acid in position 1. The cyclic analogues in question release histamine from peritoneal mast cells in rats.