



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

МОМ 16 * № 3 * 1990

УДК 547.964.4.057:577.175.852

© 1990 r.

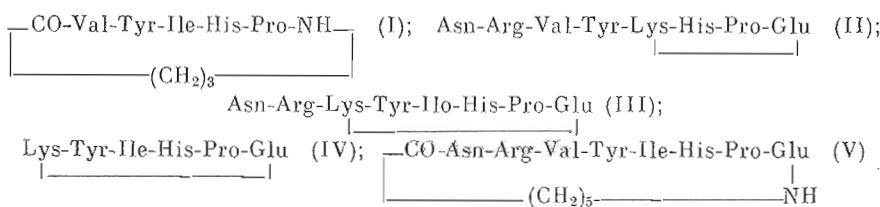
*Ю. Е. Аицанс, Д. А. Бисенцеце, И. А. Воскесалма,
Н. В. Мышлякова, Г. И. Чипенс*

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ АНГИОТЕНЗИНА

Институт органического синтеза АН ЛатвССР, Рига

Классическими методами пептидной химии синтезировано и исследовано пять новых циклоаналогов ангиотензина: [des-Asp¹, Arg²; Abu⁸, cyclo(8→3)]AT (I); [Asn¹, Lys⁵, Glu⁸, cyclo(8⁷→5⁶)]AT (II), [Asn¹, Lys³, Glu⁸, cyclo(8⁷→3⁶)]AT (III); [des-Asp¹, Arg²; Lys⁵, Glu⁸, cyclo(8⁷→5⁶)]AT (IV); [Ahx-Asn¹, Glu⁸, cyclo(8⁷→1⁶)]AT (V). Циклизация осуществляется с использованием пентаафторфениловых эфиров. Циклоаналоги ангиотензина (I)–(IV) не проявляют характерного для природного гормона действия на гладкую мускулатуру и артериальное давление. Аналог (V) ингибирует миотропное действие ангиотензина и вызывает понижение прессорного эффекта ангиотензина. Спектры КД аналогов ангиотензина (I)–(IV) и природного гормона различаются. КД соединения (V) сходен с КД для специфических антиангиотензинов ангиотензина.

Продолжая исследования по установлению взаимосвязи между пространственной структурой ангиотензина и его аналогов и их биологической активностью [1], мы синтезировали новые циклические цептиды:



Циклические структуры в этих соединениях фиксированы посредством пептидных связей между α - или ϵ -аминогруппами соответствующих остатков и α - или β -карбоксильной группой С-концевой аминокислоты. Соединение (I) моделирует возможную биологически активную циклическую структуру С-концевого гексапептида ангиотензина согласно данным конформационных расчетов [2]. В структурах соединений (II)–(IV) фиксирован потенциальный изгиб в С-концевой части молекулы, предполагаемый на основе данных физико-химических исследований [3]. Такую же С-концевую модификацию имеет соединение (V), но размер цикла существенно увеличен.

Структурно-функциональные исследования ангiotензина показывают, что боковой радикал фенилаланина имеет существенное значение при проявлении агонистических эффектов ангiotензина, но мало влияет на его связывание с клеточными рецепторами. Отсутствие бокового радикала фенилаланина характерно для специфических антагонистов ангiotензина; при этом допускаются разнообразные модификации в положение 8. Важную роль при проявлении биологических эффектов ангiotензина играют остатки тирозина, гистидина и С-концевая карбоксильная группа [4]. Алифатические аминокислотные остатки в положениях 3 и 5 вы-

Сокращения: АТ – аngiotензин, КД – круговой дихроизм, Ahx – α -аминоакапровая кислота, DMF – диметилформамид, комплекс «F» – 1 моль DCC и 3 моль пентафторфенола, DCC – N,N'-дизициклогексидикарбодимид. НОВТ – 1-оксibenзотриазол.

Схема 1

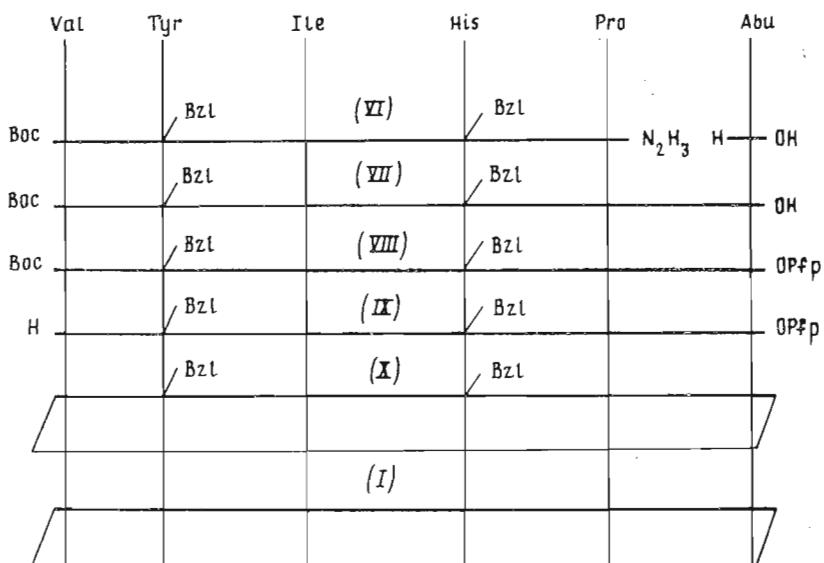
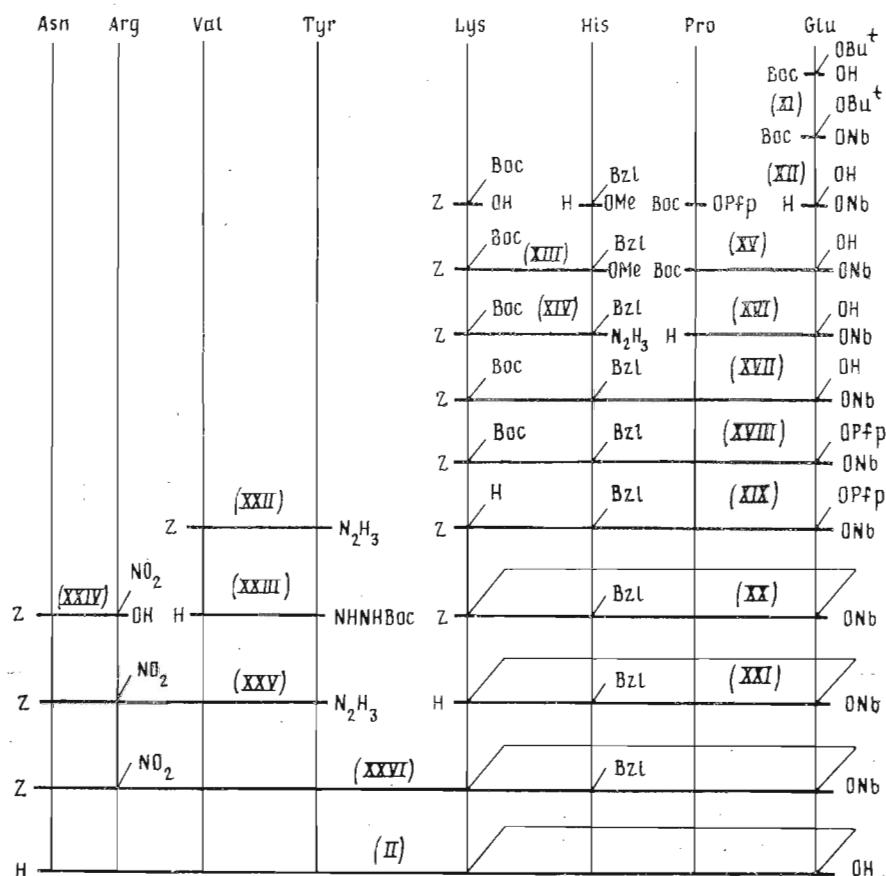


Схема 2



полняют в основном локальные стерические функции [5]. Таким образом, можно предполагать, что в синтезированных соединениях (II)–(IV) сохранены основные, функционально важные группы, определяющие их связывание специфическими рецепторами ангиотензина [6].

Соединения (I)–(V) синтезировали согласно схемам 1–4. N^α-Аминогруппу лизина блокировали бензилоксикарбонильной группой, а N^ε-ами-

Exemа 3

Ash	Arg	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Glu
Z		BOC	Bzl	(XXVII)	Bzl		
Z		OPfp	H			OMe	
Z		BOC	Bzl	(XXVIII)	Bzl		OMe
Z		BOC	Bzl	(XXIX)	Bzl		(XII) OH
Z		BOC	Bzl	(XXX)	Bzl	N ₂ H ₃	ONb
Z		BOC	Bzl	(XXXI)	Bzl		OH
Z		BOC	Bzl	(XXXII)	Bzl		ONb
Z		H	Bzl	(XXXIII)	Bzl		OPfp
Z							ONb
(XXIV)		NO ₂					
Z		OH	H				
Z				(XXXIV)	Bzl		ONb
Z		NO ₂					
Z				(XXXV)	Bzl		ONb
H							
H				(III)			OH
H					(IV)		OH

Схема 4

Ahx	Asn	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Glu
		Boc		Bzl	(VI)	Bzl	(XII)	OH
Boc	ONp H	NO_2	Boc	Bzl (XXXVII)		Bzl	N_2H_3 H	ONb OH
		(XXXVIII)	OMe			Bzl		ONb OH
Boc		NO_2		Bzl (XXXVII)		Bzl		ONb OH
Boc		OH	H	Bzl (XXXIX)		Bzl		ONb OH
Boc		NO_2		Bzl (XL)		Bzl		ONb OH
Boc	OPfp H	NO_2		Bzl (XLI)		Bzl		ONb OH
Boc		NO_2		Bzl (XLII)		Bzl		ONb OPfp
Boc		NO_2		Bzl (XLIII)		Bzl		ONb OPfp
H		NO_2		Bzl (XLIV)		Bzl		ONb
				(V)				OH

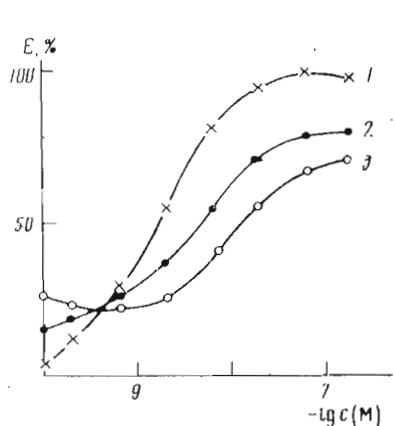


Рис. 1

Рис. 1. Кумулятивные кривые концентрация – миотропный эффект ангиотензина (1) и аргиотензина в присутствии соединения (V) в дозах 10^{-6} М/кг (2) и 10^{-5} М/кг (3) в опытах *in vitro* на изолированной ободочной кишке крысы

Рис. 2. Влияние соединения (V), введенного перед аргиотензином, на его прессорное действие. 1 – $5 \cdot 10^{-6}$ М/кг ангиотензина (принято за 100%), 2 и 3 – $5 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ М/кг соединения (V) соответственно

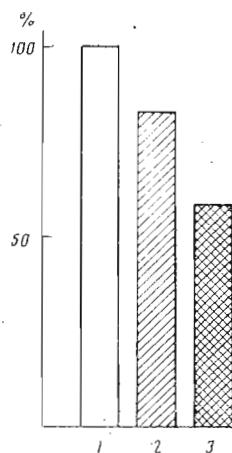


Рис. 2

ногруппу лизина, N^{α} -функцию валина и N^{ϵ} -функцию аминокапроновой кислоты – *трет*-бутилоксикарбонильной. После отщепления защитных *трет*-бутилоксикарбонильных групп циклизацию проводили методом пентафторфениловых эфиров. N^{α} -Бензилоксикарбонильную защитную группу лизина отщепляли бромистым водородом в уксусной кислоте. N -Концевой тетрапептид присоединяли азидным методом (соединение (II), схема 2), а в случае соединения (III) (схема 3) дипептид (XXIV) присоединяли методом смешанных ангидридов. Все защитные группы целевых циклоаналогов (I)–(V) отщепляли каталитическим гидрогенолизом.

Исследование биологической активности синтезированных соединений в тестах на кровяное давление наркотизированных крыс *in vivo* и гладкую мускулатуру *in vitro* на colon ascendens крысы показало, что соединения (I)–(IV) не обладают миотропным действием в интервале концентраций 10^{-9} – 10^{-6} М, не влияют на миотропный эффект ангиотензина, а также на артериальное давление крыс в дозах $2,5 \cdot 10^{-5}$ – $2,5 \cdot 10^{-3}$ М/кг. Соединение (V) начиная с концентрации 10^{-6} М/кг ингибирует миотропное действие ангиотензина. Кумулятивная кривая концентрация – эффект ангиотензина в присутствии соединения (V) перемещается вправо и уменьшается по максимуму (рис. 1). Соединение (V) обладает такжеrudиментарной прессорной активностью – 0,1% от эффекта ангиотензина. Интересные результаты получены при последовательном введении соединения (V) и ангиотензина. Введение $5 \cdot 10^{-5}$ М/кг соединения (V) уменьшает прессорный эффект ангиотензина (доза $5 \cdot 10^{-6}$ М/кг) на $17,0 \pm 4,6\%$, а увеличение дозы соединения (V) до $5 \cdot 10^{-4}$ М/кг снижает этот эффект на $41,4 \pm 11,9\%$ (рис. 2). Параллельное перемещение кривой ангиотензина в сторону высших доз в присутствии соединения (V) дает возможность предполагать конкурентный antagonизм действия (рис. 3).

Были исследованы спектры кругового дихроизма (КД) в воде и этиловом спирте. В пептидной области спектра (190–250 нм) кривые КД соединения (II) практически не меняются при переходе от водных сред к органическим (рис. 4, 1 и 2). Сильная отрицательная полоса дихроничного поглощения при 190–195 нм ($n \rightarrow \pi^*$ -переход амидного хромофора) и слабая отрицательная полоса при 235–238 нм напоминает спектр КД пептидов с неупорядоченной структурой, например полиглутаминовой кислоты при pH 7,6 [7]. Максимум при 225 нм свидетельствует о положительном вкладе хромофоров боковых цепей ароматических аминокислотных остатков, особенно остатка тирозина.

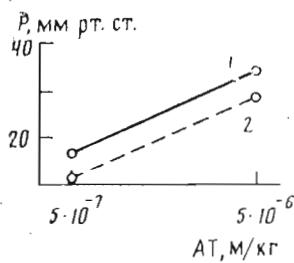


Рис. 3

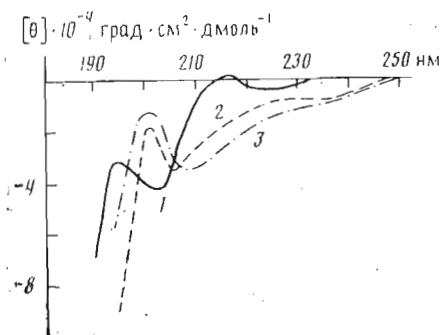


Рис. 5

Рис. 3. Влияние соединения (V) в дозе $5 \cdot 10^{-5}$ М/кг (2) на прессорный эффект ангиотензина (1)

Рис. 4. Спектры КД соединений (II) (1, 2) и (IV) (3, 4) в воде и этиловом спирте соответственно

Рис. 5. Спектры КД ангиотензина в воде (1) и соединения (III) в воде (2) и этиловом спирте (3)

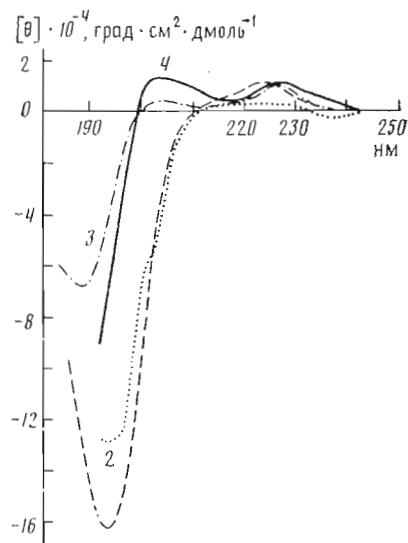


Рис. 4

В случае соединений (III) и (IV) вид спектра также существенно не меняется при смене растворителей (рис. 4, 5). В спектре соединения (IV) обе положительные полосы дихроичного поглощения (рис. 4, 3 и 4) соответствуют спектру КД свободного тирозина [8, 9]. Как известно из спектров КД модельных соединений [10], вклад ароматических хромофоров преобладает над $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -переходами амидных хромофоров. Даже если у этого циклопептида с большим удельным весом ароматических аминокислот имеется упорядоченная вторичная структура, это нельзя определить по спектру КД, на который сильно влияют ароматические хромофоры. В спектрах КД соединения (III) (рис. 5, 2, 3) можно увидеть некоторое сходство со спектром ангиотензина в воде (рис. 5, 1), но отрицательный минимум дихроичного поглощения молекул ангиотензина при 203 нм сдвинут на 2–4 нм в сторону длинных волн.

Спектр КД соединения (I) в воде и этиловом спирте (рис. 6, 2, 3) существенно не отличается от спектра аналога $[Ile^5, Ala^8]AT$ (XLV) в трифторэтаноле (рис. 6, 1). По мнению авторов [10], этому линейному аналогу ангиотензина в трифторэтаноле свойственна α -спиральная конформация. Спектры соединения (V) в воде и этиловом спирте (рис. 7, 1, 2) существенно не отличаются от спектров линейных антагонистов ангиотензина – $[Ile^5, Ala^8]AT$ (XLV) и $[Ile^8]AT$ (XLVI) [10] (рис. 7, 3, 4). В дальней УФ-области спектра наблюдается минимум ниже 200 нм, характерный для антагонистов ангиотензина, но в области 210–240 нм прослеживаются признаки спектра ангиотензина в воде (рис. 7, 5).

Хироптические свойства циклических аналогов ангиотензина (соединения (I)–(IV)), не связывающихся со специфическими рецепторами ангиотензина, отличаются от природного гормона и его антагонистов. С другой стороны, спектры КД соединения (V), обладающего специфической активностью, имеют определенное сходство с таковым для антагонистов ангиотензина. Благодаря относительно большому размеру цикла соеди-

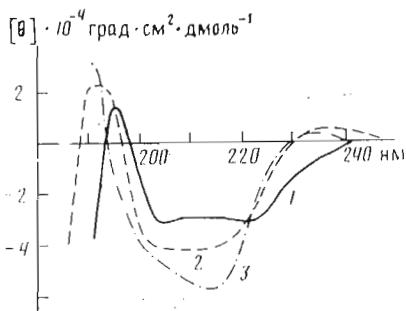


Рис. 6

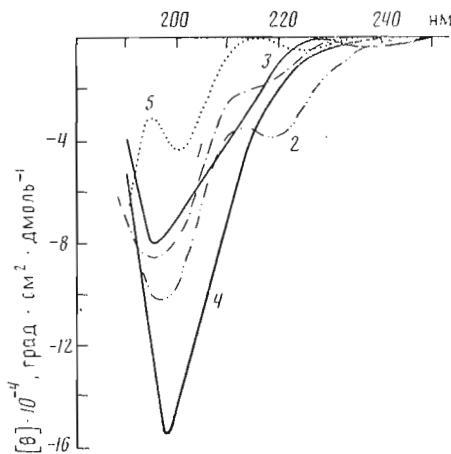


Рис. 7

Рис. 6. Спектры КД $[He^5, Ala^8]AT$ в трифторэтаноле (1) и соединения (I) в воде (2) и этиловом спирте (3)

Рис. 7. Спектры КД соединения (V) в воде (1) и этиловом спирте (2), $[He^5, Ala^8]AT$ в воде, pH 6 (3), $[He]^8AT$ и ангиотензина в воде (4, 5 соответственно)

пение (V), очевидно, может иметь в какой-то мере сходные конформационные свойства с природным гормоном в растворе, что, возможно, и определяет наилучшие специфической биологической активности у этого аналога ангиотензина.

Суммируя результаты, можно сделать вывод, что в данной работе не получены какие-либо данные, подтверждающие как «биологически активную» структуру ангиотензина, предложенную на основе теоретического конформационного анализа, так и роль потенциальных изгибов в C-концевой части молекулы, стабилизирующих пространственную структуру ангиотензина, для проявления биологических эффектов этого гормона. Из синтезированных аналогов ангиотензина с ограниченной конформационной подвижностью интерес для дальнейших исследований вызывает лишь циклопептид (V) и родственные ему аналоги. При этом необходимо установить оптимальную для связывания рецептором величину цикла и исследовать структуру такого аналога методом ЯМР.

Экспериментальная часть

Для синтеза использовали L-аминокислоты и их производные фармы 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 (рН 1,9) и 1 М (рН 2,4) уксусной кислоте при градиенте потенциала 18 В/см, электрофоретическая подвижность соединений приведена по отношению к гистидину (E_{His}). ТСХ осуществляли на пластинках Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (ФРГ); приведены хроматографические подвижности R_f в следующих системах: хлороформ – этанол – этилацетат – уксусная кислота – вода, 85 : 5 : 8 : 2 : 0,25 (A); хлороформ – метанол – вода, 85 : 10 : 5 (B); хлороформ – этанол – n-бутанол – этилацетат – вода, 10 : 6 : 4 : 3 : 1 (B); бутанол – уксусная кислота – вода, 4 : 1 : 1 (Г); этилацетат – n-бутанол – уксусная кислота – вода, 2 : 1 : 1 : 1 (Д); этилацетат – пиридин – уксусная кислота – вода, 5 : 3 : 1 : 2 (Е); пиридин – n-бутанол – уксусная кислота – вода, 10 : 15 : 3 : 12 (Ж); n-бутанол – этанол – вода – уксусная кислота, 16 : 2 : 6 : 1 (З); хлороформ – этанол – этилацетат – уксусная кислота – вода, 285 : 5 : 8 : 2 : 0,25 (И); хлороформ – метанол – уксусная кислота – вода, 120 : 41 : 6 : 6 (К); хлороформ – этанол – изопропанол – этилацетат – вода, 10 : 6 : 4 : 3 : 1 (Л); n-бутанол – пиридин – уксусная кислота – вода, 10 : 6 : 4 : 3 : 1 (П).

та — вода, 42 : 24 : 4 : 35 (М); *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 38 : 20 : 24 : 5 (Н). Вещества обнаруживали в УФ-свете, нингидрином, реактивами Сакагучи, Бартона, Паули и хлорбензидином. Для preparативной адсорбционной хроматографии использовали хроматограф Jobin Yvon Chromatopack Prep 10 (Франция) с силикагелем Н 60 (Merck, ФРГ) и хроматографические колонки, наполненные силикагелем типа Li Chroprep TM Si 60 Lobar (Merck).

Элюент контролировали в проточном абсортиметре Uvicord II фирмы LKB при 280 нм. Препартивную и аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на хроматографе Du Pont 830 (колонка Zorbax C₈).

Аминокислотный анализ гидролизатов пептидов выполняли на анализаторе Liquimat III (США) после 24-часового гидролиза пептидов в 0,1 N HCl 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).

Легколетучие растворители упаривали в вакууме водоструйного насоса, а диметилформамид — при 0,5—1,0 мм рт. ст. Температура бани во всех случаях не превышала 35° С. Вещества высушивали в вакууме над P₂O₅/KOH и серной кислотой. Конечные продукты получали в виде лиофилизатов. Биологическую активность синтезированных аналогов ангиотензина исследовали в опытах *in vivo* и *in vitro*, в качестве стандартных препаратов использовали ангиотензинамид (производство Экспериментального завода ИОС АН ЛатвССР). В опытах *in vivo* определяли влияние синтезированных соединений на артериальное давление крыс. Эксперименты проводили на белых крысах обоего пола массой 180—200 г, наркотизированных уретаном. Вещество вводили в бедренную вену в виде инъекций в объеме 0,1 мл/200 г в дозах 0,5—500 мкг/мл. Артериальное давление регистрировали из общей сонной артерии при помощи датчика давления Bentley Trantec Pressure Transducer на 2-канальном регистрирующем приборе Gemini (Италия). Миотропную активность изучали в опытах *in vitro* согласно методике [11] посредством регистрации изотонических сокращений восходящей ободочной кишки (*colon ascendens*) крыс.

Спектры КД записывали на дихрографе Jobin Yvon Mark III (Франция). Дихроограф калибровали по стандартам 10-камфорсульфоновой кислоты и эпиандростерона. Для записи спектров использовали кюветы из плавленого кварца фирмы Hellma с длиной оптического пути 1 см в спектральном диапазоне 300—250 нм и 0,1—0,01 см в области 250—180 нм. Концентрация растворов в воде и этаноле 10⁻³—10⁻⁴ М. Полученные спектры обрабатывали на ЭВМ Wang 2200 VP (СПА) с устройством ввода графической информации с помощью специально разработанного пакета программ [12]. Молекулярную эллиптичность [θ] измеряли в град·см²/дмоль. Все соединения использовались в ацетатной форме.

Boc-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Abu-OH (VII). К охлажденному до -20° С раствору 1,84 г (2 ммоль) соединения (VI) [13] в 10 мл DMF добавляли 2,0 мл (8 ммоль) 4 М раствора HCl в этилацетате и 0,23 мл (2 ммоль) трет-бутилнитрита в 2 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при -20° С и 10 мин при -5° С, потом охлаждали до -40° С и добавляли охлажденный до -5° С раствор 1,1 мл (8 ммоль) триэтиламина в 2 мл DMF (рН реакционной смеси 7—7,5), затем при -20° С раствор 0,2 г (2 ммоль) H-Abu-OH и 0,28 мл (2 ммоль) триэтиламина в 5 мл DMF. Перемешивали 1 ч при 0—5° С и выдерживали 24 ч при 4° С. Реакционную смесь упаривали, остаток промывали эфиrom и очищали хроматографией на силикагеле. Элюент — система А. Выход 1,3 г (67%); т. пл. 180—182° С; [α]_D -23° (с 1, DMF); R, 0,24 (Б), 0,48 (Б), 0,2 (Г).

Boc-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Abu-OHfr (VIII). К раствору 0,5 г (0,51 ммоль) соединения (VII) в 10 мл DMF при 0° С добавляли 0,09 мл (0,51 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина и 0,58 г (0,77 ммоль) комплекса «F» в 2 мл DMF. Перемешивали 48 ч при 20° С. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали и остаток промывали эфиrom. Выход 0,52 г (87%); R, 0,48 (Б), 0,78 (Б).

2HCl·H-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Abu-OPfp (IX). К раствору 0,52 г (0,45 ммоль) соединения (VIII) в уксусной кислоте добавляли 1 мл 4 М раствора HCl в уксусной кислоте. Перемешивали 20 мин при 20° С и упаривали. Остаток промывали эфиром. Выход 0,49 г (97%); R_f 0,47 (B), 0,6 (Д), 0,44 (Г).

Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Abu (X). К охлажденному до 15° С 500 мл диоксана добавляли 0,31 мл (1,72 ммоль) N,N-дизопропилэтиламина и 0,49 г (0,43 ммоль) раствора соединения (IX) в 20 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 72 ч при 20° С, упаривали, остаток промывали эфиром и очищали хроматографией на силикагеле. Элюент — система Б. Выход 0,12 г (32%); R_f 0,34 (Б), 0,29 (Г).

Val-Tyr-Ile-His-Pro-Abu (I). 0,12 г (0,14 ммоль) соединения (X) растворяли в 20 мл смеси метанол — уксусная кислота — вода (5 : 1 : 1) и гидрировали 25 ч в токе водорода над Pd-чернью. Pd-чёрнь отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток промывали эфиром. Выход после очистки хроматографией на колонке Zorbax C₈ (2,12×25 см) в системе 35% CH₃CN — 65% 0,2 М NH₄OOCCH₃, 0,07 г (77%); т. пл. 198° С (разл.); $[\alpha]_D^{20} -79^\circ$ (с 0; 1 М CH₃COOH); R_f 0,57 (Е), 0,55 (Ж); E_{His} 0,55 (рН 1,9). В масс-спектре (полевая десорбция) обнаружены квазимолекулярные пики 694 (M)⁺, 717 ($M+Na$)⁺. Аминокислотный анализ: Val 0,93 (1), Тут 0,92 (1), Иле 1,0 (1), His 1,01 (1).

Boc-Glu(OBu')-ONb (XI). К раствору 10 г Boc-Glu(OBu')-OH (33 ммоль) в 100 мл DMF добавляли 10,7 г (50 ммоль) *n*-нитробензилбромида и 6,9 мл (50 ммоль) триэтиламина. Перемешивали 4 ч при 20° С, DMF частично упаривали, осадок отфильтровывали и промывали этил-ацетатом, фильтрат промывали последовательно 5% раствором NaHCO₃, водой, 10% раствором NaHSO₄ и снова водой. Органическую фазу высушивали MgSO₄, и упаривали, остаток промывали эфиром. Выход 14 г (97%); т. пл. 110–115° С; $[\alpha]_D^{20} -18^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,72 (Б), 0,62 (А).

CF₃COOH·H-Glu-ONb (XII). 13,8 г (31,5 ммоль) соединения (XI) растворяли в 150 мл CF₃COOH, выдерживали 1,5 ч при 20° С, упаривали и остаток промывали эфиром. Выход 12,3 г (99%); $[\alpha]_D^{20} +10,6^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,63 (Е); E_{His} 0,67 (рН 2,4).

Z-Lys(Boc)-His(Bzl)-OMe (XIII). К охлажденному до −2° С раствору 13,6 г (35,6 ммоль) Z-Lys(Boc)-OH и 9,63 г (71,3 ммоль) НОВТ в 100 мл DMF добавляли 7,34 г (35,6 ммоль) DCC в 20 мл DMF, перемешивали 1 ч при −2° С и добавляли раствор H-His(Bzl)-OMe, приготовленный следующим образом: к суспензии 11,8 г (36,5 ммоль) 2HCl··His(Bzl)-OMe в 100 мл хлороформа добавляли 75 мл 10% раствора NaHCO₃. Хлороформный слой отделяли, водяной слой экстрагировали 3 раза хлороформом. Органические слои объединяли и 4 ч сушили MgSO₄, отфильтровывали и упаривали. Остаток растворяли в 30 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при 4° С. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в этил-ацетате и промывали последовательно 5% раствором NaHCO₃, водой, 10% раствором KHSO₄ и снова водой. Органический слой сушили над MgSO₄ и упаривали. Остаток высушивали. Выход 15,1 г (68%); R_f 0,61 (З).

Z-Lys(Boc)-His(Bzl)-N₂H₃ (XIV). К раствору 15,1 г (24,3 ммоль) соединения (XIII) в 150 мл метанола добавляли 15 мл гидразингидрата. Выдерживали 48 ч при 20° С, упаривали. К остатку добавляли 200 мл воды и осадок отфильтровывали. Продукт перекристаллизовывали из воды. Выход 10,1 г (66,8%); т. пл. 145–147° С; $[\alpha]_D^{20} -5,8^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,1 (А), 0,3 (Б); E_{His} 0,41 (рН 1,9).

Boc-Pro-Glu-ONb (XV). К охлажденному до 0° С раствору 5,2 г (18,4 ммоль) соединения (XII) в 20 мл DMF добавляли 2,54 мл (18,4 ммоль) триэтиламина и 7,2 г (18,4 ммоль) Boc-Pro-OPfp в 20 мл DMF. Перемешивали 24 ч при 20° С и упаривали. Выход после очистки

хроматографией на силикагеле (элюент – система И) 4,7 г (51%); $[\alpha]_D^{20}$ -39° (*c* 1, DMF); R_f 0,46 (Б), 0,6 (А); E_{HIs} 0,25 (рН 1,9).

HCl·H-Pro-Glu-ONb (*XVI*) получали из 4,5 г (9,4 ммоль) соединения (*XV*) и 8,25 мл (33 ммоль) 4 М раствора HCl в этилацетате аналогично соединению (*IX*). Выход 3,5 г (90%); $[\alpha]_D^{20}$ -43° (*c* 1, DMF); R_f 0,2 (Б); E_{HIs} 0,7 (рН 1,9).

Z-Lys(Boc)-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (*XVII*) получали аналогично соединению (*VII*), исходя из 3,2 г (5,1 ммоль) соединения (*XIV*), 3,83 мл (15,3 ммоль) 4 М раствора HCl в этилацетате, 0,59 мл (5,1 ммоль) *трет*-бутилнитрата, 2,11 мл (15,3 ммоль) триэтиламина и раствора H-Pro-Glu-ONb, приготовленного добавлением 0,7 мл (5,1 ммоль) триэтиламина к охлажденному до 0°C раствору 2,12 г (5,1 ммоль) соединения (*XVI*) в 15 мл DMF. Выход после очистки хроматографией на силикагеле (элюент – система Б) 3,66 г (73,5%); т. пл. 103–105 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20}$ -25° (*c* 1, DMF); R_f 0,65 (Б), 0,13 (А); E_{HIs} 0,4 (рН 1,9).

2HCl·Z-Lys-His(Bzl)-Pro-Glu(OPfp)-ONb (*XIX*). Соединение (*XVIII*) (схема 2) получали аналогично соединению (*VIII*) из 2 г (2,1 ммоль) соединения (*XVII*), 2,4 г (3,15 ммоль) комплекса «F» и 0,36 мл (2,1 ммоль) N,N-дизопропилэтамина. После упаривания остаток растворяли в уксусной кислоте и добавляли 2 мл 4 М раствора HCl в уксусной кислоте. Перемешивали 30 мин при 20°C и упаривали. Остаток промывали эфиром. Выход 2 г (88%); R_f 0,58 (Д), 0,2 (Б), 0,3 (Г).

Z-Lys-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (*XX*) получали аналогично соединению (*X*) из 2 г (1,8 ммоль) соединения (*XIX*) в 50 мл DMF и 1,23 мл (7,2 ммоль) N,N-дизопропилэтамина. Продукт растворяли в 5 мл хроматографической системы Б и наносили на колонку с силикагелем (Lobar, Size B). Элюировали с системой В и фракции, содержащие чистый пептид, объединяли, упаривали и промывали эфиром. Выход 0,7 г; т. пл. 125–128 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20}$ $-8,7^\circ$ (*c* 1, DMF); R_f 0,8 (К), 0,67 (Б).

H-Lys-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (*XXI*). К раствору 0,4 г (0,47 ммоль) соединения (*XX*) в уксусной кислоте добавляли 0,35 мл (1,41 ммоль) 4 М раствора бромистого водорода в уксусной кислоте. Выдерживали 20 мин при 20°C и осаждали эфиром. Высушивали. Выход 0,37 г (90%); т. пл. 105–110 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20}$ $+8,8^\circ$ (*c* 1, DMF); R_f 0,45 (Д); E_{HIs} 0,6 (рН 1,9).

H-Val-Tyr-NHNH₂Boc (*XXII*) получали аналогично соединению (*VII*) из 9,86 г (23 ммоль) соединения (*XXII*) [14], 2,65 мл (23 ммоль) *трет*-бутилнитрита, 17,25 мл (69 ммоль) 4 М раствора HCl в этилацетате; 3,04 г (23 ммоль) BocNNH₂ и 9,52 мл (69 ммоль) триэтиламина в 10 мл DMF. По окончании реакции реакционную смесь выливали в насыщенный раствор NaCl, экстрагировали этилацетатом, органические слои объединяли и промывали последовательно 5% раствором NaHCO₃, водой, 10% раствором NaHSO₄, и снова водой, высушивали и упаривали. Остаток растворяли в 50 мл этанола и гидрировали в токе водорода над 3 г Pd-черни. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Продукт растворяли в этаноле и осаждали эфиром. Выход 7,9 г (87,6%); т. пл. 82–85 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20}$ $-9,7^\circ$ (*c* 1, DMF), R_f 0,5 (Г); E_{HIs} 0,7 (рН 1,9).

TFA·Z-Asn-Arg(NO₂)·Val-Tyr-N₂H₃ (*XXV*) получали аналогично соединению (*XIII*) из 9,35 г (20 ммоль) соединения (*XXIV*) [14], 5,4 г (40 ммоль) НОВТ, 4,13 г (20 ммоль) DCC и 7,89 г (200 ммоль) соединения (*XXIII*). После упаривания остаток растирали с 10% раствором NaHCO₃, отфильтровывали, осадок промывали водой, 10% раствором NaHSO₄ и водой. Вещество высушивали, растворяли в 30 мл трифторуксусной кислоты, перемешивали 30 мин и упаривали. Остаток промывали эфиром и высушивали. Выход 16,4 г (95,6%); т. пл. 165–167 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20}$ -10° (*c* 1, DMF); R_f 0,52 (Д); 0,75 (Ж).

Z-Asn-Arg(NO₂)·Val-Tyr-Lys-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (*XXVI*) получали аналогично соединению (*VII*), исходя из 0,3 г (0,35 ммоль) соединения (*XXV*), 0,26 мл (1,05 ммоль) 4 М раствора HCl в этилацетате, 0,04 мл

(0,35 ммоль) трет-бутилнитрита, 0,15 мл триэтиламина и раствора H-Lys-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb, приготовленного добавлением 0,094 мл

(0,68 ммоль) триэтиламина к охлажденному до 0° С раствору 0,3 г (0,34 ммоль) соединения (XXI) в 5 мл DMF. Реакционную смесь выливали в 200 мл воды при 0° С. Осадок отфильтровывали и промывали водой. Выход 0,3 г (62,5%); т. пл. 208° С (разл.); $[\alpha]_D^{20} -16^\circ$ (с 0,5, DMF); R_f 0,3 (Б), 0,5 (К).

H-Asn-Arg-Val-Tyr-Lys-His-Pro-Glu-OH (II) получали аналогично соединению (I) из 0,3 г (0,24 ммоль) соединения (XXVI). Выход после очистки обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка Zorbax C₈ размером 2,12×25 см, элюент — 10% C₂H₅OH, 90% 0,1 М NH₄OOCCH₃) 0,084 г (40%); т. пл. 130° С (разл.); $[\alpha]_D^{20} -37,6^\circ$ (с 1; 1 М CH₃COOH); R_f 0,33 (Ж), 0,17 (Д); E_{HIS} 0,77 (рН 1,9). Аминокислотный анализ: Asp 0,72 (1), Arg 0,75 (1), Val 0,77 (1), Tyr 0,93 (1), Lys 1,19 (1); His 0,75 (1), Pro 0,90 (1), Glu 1,0 (1).

Z-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-OMe (XXVIII) получали аналогично соединению (XV), исходя из 7 г (8,8 ммоль) соединения (XXVII) [13], 4,5 мл (26,4 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина и 4,9 г (9 ммоль) Z-Lys(Boc)-OPfp. Выход 6,6 г (69%); т. пл. 96—98° С; $[\alpha]_D^{20} -18^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,7 (Б), 0,8 (Ж), E_{HIS} 0,54 (рН 1,9).

Z-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-N₂H₃ (XXIX). К раствору 6,4 г (5,9 ммоль) соединения (XXVIII) в 50 мл DMF добавляли 50 мл свежеприготовленного 50% раствора гидразина в DMF, выдерживали 64 ч при 20° С и выливали в 500 мл насыщенного раствора NaCl, осадок отфильтровывали и промывали водой. Выход 5,7 г (90%); т. пл. 100—103° С; $[\alpha]_D^{20} -26^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,6 (Л); E_{HIS} 0,55 (рН 1,9).

Z-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (XXX) получали аналогично соединению (VII) из 3,1 г (2,9 ммоль) соединения (XXIX), 2,9 мл (11,6 ммоль) 4 М раствора HCl в этилацетате, 0,33 мл (2,9 ммоль) трет-бутилнитрита, 1,6 мл (11,6 ммоль) триэтиламина и раствора 0,92 г (2,9 ммоль) соединения (XII) и 0,4 мл (2,9 ммоль) триэтиламина в 5 мл DMF. Продукт промывали эфиром и очищали хроматографией на силикагеле в системе А. Выход 2,6 г (68,2%); т. пл. 105—107° С; $[\alpha]_D^{20} -28,6^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,74 (Л), 0,16 (А).

Z-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu(OPfp)-ONb (XXXI) получали аналогично соединению (VIII) из 0,53 г (0,4 ммоль) соединения (XXX), 0,07 мл (0,4 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина и 0,45 г (0,6 ммоль) комплекса «F». Выход 0,53 г (90%); R_f 0,82 (Л), 0,77 (А).

2HCl·Z-Lys-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu(OPfp)-ONb (XXXII) получали аналогично соединению (IX) из 0,53 г (0,35 ммоль) соединения (XXXI) и 0,38 мл (1,23 ммоль) 4 М раствора HCl в уксусной кислоте. Выход 0,49 г (94,3%); R_f 0,42 (Е).

Z-Lys-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (XXXIII) получали аналогично соединению (X) из 0,49 г (0,33 ммоль) соединения (XXII) и 0,23 мл (1,32 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина. Выход после очистки хроматографией на силикагеле (элюент — система А) 0,21 г (52,5%); т. пл. 135—137° С; $[\alpha]_D^{20} -22^\circ$ (с 0,5, DMF); R_f 0,63 (Б), 0,83 (К); E_{HIS} 0,63 (рН 1,9).

2HBr·H-Lys-Tyr-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (XXXIV). К раствору 0,17 г (0,14 ммоль) соединения (XXXIII) в 3 мл уксусной кислоты добавляли 0,11 мл (0,42 ммоль) 4 М раствора HBr в уксусной кислоте. Перемешивали 30° мин при 20° С и выливали в 200 мл эфира. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали. Выход 0,16 г (97%); т. пл. 92—95° С; $[\alpha]_D^{20} -3^\circ$ (с 0,5, DMF); R_f 0,55 (Д), 0,75 (Е); E_{HIS} 0,67 (рН 2,4).

Z-Asn-Arg(NO₂)-Lys-Tyr-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (XXXV) получали аналогично соединению (XIII) из 0,065 г (0,14 ммоль) соединения (XXIV), 0,029 г (0,14 ммоль) DCC и 0,02 г (0,14 ммоль) НОВТ, 0,15 г (0,13 ммоль) соединения (XXXIV) и 0,05 мл (0,26 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина.

Реакционную смесь отфильтровывали, фильтрат выливали в смесь, состоящую из 50 мл насыщенного раствора NaCl и 15 мл 10% раствора NaHCO₃. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали водой. Выход 0,17 г (90%); т. пл. 140–145° С; $[\alpha]_D^{20} -21,2^\circ$ (с 0,5, DMF); R_f 0,6 (Б).

H-Asn-Arg-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Glu-OH (III) получали аналогично соединению (I) из 0,17 г (0,12 ммоль) соединения (XXXV). Продукт пересаждали из этанола эфиром. Выход 0,06 г (55%); т. пл. 221° С (разл.); $[\alpha]_D^{20} -39^\circ$ (с 0,4; 1 М CH₃COOH); R_f 0,44 (М), 0,21 (Е); E_{HIS} 0,7 (рН 1,9). Аминокислотный анализ: Asp 1,0 (1), Arg 0,97 (1), Lys 1,06 (1), Tyr 0,89 (1), Ile 1,0 (1), His 1,1 (1), Pro 1,0 (1), Glu 1,09 (1).

В масс-спектре (полевая десорбция) обнаружены квазимолекулярные пики 1038 ($M+1$)⁺, 1019 ($M-H_2O$)⁺, 1060 ($M+Na$)⁺, 1077 ($M+K$)⁺.

H-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Glu-OH (IV) получали аналогично соединению (I) из 0,06 г (0,05 ммоль) соединения (XXXIII). После упаривания остаток промывали эфиром и этанолом. Выход 0,03 г (70%); т. пл. 205–207° С; $[\alpha]_D^{20} -13,5^\circ$ (с 0,2; 1 М CH₃COOH); R_f 0,24 (Д), 0,58 (М); E_{HIS} 0,71 (рН 1,9). Аминокислотный анализ: Lys 1,1 (1), Tyr 1,0 (1), Ile 1,0 (1), His 1,08 (1), Pro 0,9 (1), Glu 1,08 (1).

Boc-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (XXXVI) получали аналогично соединению (XXX) из 9,22 г (10 ммоль) соединения (VI), 10 мл (40 ммоль) 4 М раствора HCl в этилацетате, 1,15 мл (10 ммоль) трет-бутилнитрита и 5,52 мл (40 ммоль) триэтиламина и раствора 3,2 г (10 ммоль) соединения (XII) и 1,38 мл (10 ммоль) триэтиламина в 6 мл DMF. После упаривания DMF остаток промывали водой и отфильтровывали. Выход 9,25 г (79%); т. пл. 155–156° С; R_f 0,88 (Б), 0,68 (Г); E_{HIS} 0,49 (рН 1,9).

2HCl·H-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (XXXVII) получали из соединения (XXXVI) аналогично соединению (IX) с выходом 96%. Т. пл. 162–164° С; R_f 0,92 (Е), 0,73 (Д), 0,62 (Л), E_{HIS} 0,58 (рН 1,9).

Boc-Asn-Arg(NO₂)-OH (XXXVIII). К охлажденному до 0° С раствору 11,44 г (42 ммоль) HCl·Arg(NO₂)-OMe в 30 мл DMF добавляли 5,85 мл (42 ммоль) триэтиламина и 15 г (42 ммоль) Boc-Asn-ONp в 30 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20° С и упаривали. Остаток промывали эфиром и высушивали. Полученное вещество растворяли в 40 мл 1 М раствора NaOH, перемешивали 30 мин при 20° С, добавляли 100 мл воды и продолжали перемешивание еще 1 ч. Реакционную смесь отфильтровывали, к фильтрату добавляли 10% раствор NaHSO₄ до рН 7 и экстрагировали *n*-бутанолом (5×50 мл). Органический слой промывали водой, частично упаривали, прибавляли 20 мл смеси этанол – бензол (4 : 1) и упаривали. Остаток промывали эфиром. Выход 11 г (59,8%); т. пл. 135–137° С; $[\alpha]_D^{20} -7,6^\circ$ (с 1, DMF); R_f 0,36 (Е).

Boc-Asn-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (XXXIX) получали аналогично соединению (XIII) из 0,23 г (0,5 ммоль) соединения (XXXVIII), 0,14 г (1,06 ммоль) НОВТ, 0,09 г (0,44 ммоль) DCC, 0,5 г (0,44 ммоль) соединения (XXXVII) и 0,15 мл (0,88 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат выливали в смесь, состоящую из насыщенного раствора NaCl и 30 мл насыщенного раствора KHSO₄. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали водой. Продукт очищали на силикагеле (элюент – система Б). Выход 0,47 (72%); т. пл. 205–207° С; R_f 0,37 (Б), 0,57 (Г).

2HCl·H-Asn-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Gru-ONb (XL) получали аналогично соединению (IX) из 0,46 г (0,31 ммоль) соединения (XXXIX) и 0,3 мл (1,24 ммоль) 4 М раствора HCl в уксусной кислоте. Выход 0,43 г (95%); т. пл. 176–180° С; R_f 0,63 (Е); 0,66 (Ж); E_{HIS} 0,5 (рН 1,9).

Boc-Ahx-Asn-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (XLI) получали аналогично соединению (XV) из 0,4 г (0,3 ммоль) соединения (XL), 0,45 мл (0,9 ммоль) N,N-диизопропилэтиламина и 0,18 г (0,45 ммоль) Boc-Ahx-OPfp. После упаривания остаток промывали эфиром. Выход по-

ле очистки на силикагеле (Lobar, Size B, элюент — система В) 0,24 г (54,5%); R_f 0,35 (В), 0,8 (Н).

Boc-Ahx-Asn-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu(OPfp)-ONb (XLII) получали аналогично соединению (VIII) из 0,24 г (0,15 ммоль) соединения (XLI) и 0,17 г (0,23 ммоль) комплекса «F». Выход 0,23 г (88,4%). R_f 0,55 (В), 0,52 (Г), 0,77 (Ж).

2HCl·H-Ahx-Asn-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu(OPfp)-ONb (XLIII) получали аналогично соединению (IX) из 0,23 г (0,13 ммоль) соединения (XLII) и 0,52 мл 4 М раствора HCl в уксусной кислоте. Выход 0,21 г (93%); R_f 0,58 (Ж), 0,62 (В).

Ahx-Asn-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Bzl)-Pro-Glu-ONb (XLIV) получали аналогично соединению (Х) из 0,21 г (0,12 ммоль) соединения (XLIII) и 0,012 мл (0,35 ммоль) N,N-дизопропилэтамидина. Выход после очистки на силикагеле (Lobar, Size B, элюент — система А) 0,018 г (10%); R_f 0,35 (А), 0,41 (Б), 0,87 (3).

Ahx-Asn-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Glu-OH (V) получали аналогично соединению (I) из 0,018 г (0,012 ммоль) соединения (XLIV). После упаривания остаток промывали эфиром и этанолом. Выход 0,011 г (73,3%); т. пл. 173–176°C; $[\alpha]_D^{20} -49^\circ$ (с 0,4; 1 М CH₃COOH); R_f 0,4 (Е), 0,45 (Ж), 0,3 (Н). Аминокислотный состав: Ahx 0,98 (1), Asp 1,14 (1), Arg 1,02 (1), Val 0,91 (1), Тир 1,04 (1), Ile 1,0 (1), His 1,09 (1), Pro 1,2 (1), Glu 1,12 (1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бисенцеце Д. А., Анцанс Ю. Е., Мышилякова Н. В., Кублис Г. Г., Порункевич Е. А., Раткевич М. П., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 149–159.
2. Nikiforovich G. N. // J. Mol. Struct. 1986. V. 134. P. 325–340.
3. Секаус И. П., Лиепиньш Э. Э., Анцанс Ю. Е., Берга Д. А., Чипенс Г. И. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 3. С. 971–979.
4. Aumelas A., Sakarellos C., Lintner K., Fermandjian S., Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 7. P. 1881–1885.
5. Fermandjian S., Piriou F., Sakarellos C., Lintner K. // Biopolymers. 1981. V. 20. № 9. P. 1971–1983.
6. Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M. // Angiotensin. Handbook of experimental pharmacology. New Ser. XXXVII/Eds Page I. H., Bumpus F. M. N. Y., 1974. P. 126–161.
7. Holzawarth G., Doty P. // J. Amer. Chem. Soc. 1965. V. 87. № 1. P. 218–228.
8. Greff D., Fermandjian S., Fromageot P., Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 61. № 1. P. 297–305.
9. Juy M., Lam-Thanh H., Fermandjian S. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1982. V. 20. № 4. P. 298–307.
10. Fermandjian S., Morgat J.-L., Fromageot P. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 24. № 2. P. 252–258.
11. Van Rossum J. M. // Arch. Int. Pharmacodyn. 1963. V. 143. № 3–4. P. 299–330.
12. Кацаев Б. С., Голлендер В. Е., Силис Я. Я. 4-я Международная конференция по применению ЭВМ в химии. Новосибирск, 1978. С. 1–29.
13. Чипенс Г. И., Анцанс Ю. Е., Берга Д. А., Лиепиньш Э. Э., Мисиня Н. П., Пида-не З. П., Секаус И. П. Циклический аналог ангиотензина, обладающий способностью ингибировать прессорное и миотропное действие ангиотензина. А. с. 1067796 СССР // Б. И. 1986. № 2. С. 284.
14. Анцанс Ю. Е., Чипенс Г. И. // Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим. 1978. № 1. С. 89–93.

Поступила в редакцию
26.VI.1989

J. ANCĀNS, D. BISENIECE, I. VOSEKALNA, N. MYSHLIAKOVA, G. CHIPENS

SYNTHESIS AND STUDY OF CYCLIC ANALOGUES OF ANGIOTENSIN

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

Five angiotensin cycloanalalogues have been synthesised by classical methods of peptide chemistry, cyclisation being carried out via pentafluorophenyl esters. Cycloanalalogues (I–IV) with a fixed potential turn in the C-terminal part of the angiotensin molecule inferred on the basis of physico-chemical data do not possess angiotensin-like activity. Compounds (V) with enlarged cycle shows decreased pressor effects as compared with angiotensin. By means of circular dichroism chiroptical properties of the compounds in water and ethanol were examined.