БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 7 * № 3 * 1981

УДК 547.964.4:577.17

СИНТЕЗ ЛИНЕЙНЫХ И ЦИКЛИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ АНГИОТЕНЗИНА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ В ПОЛОЖЕНИЯХ 1 И 5

Вегнер Р. Э., Чипенс Г. И., Гринштейне И. В., Мышлякова И. В., Афанасьева Г. А., Восекална И. А.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

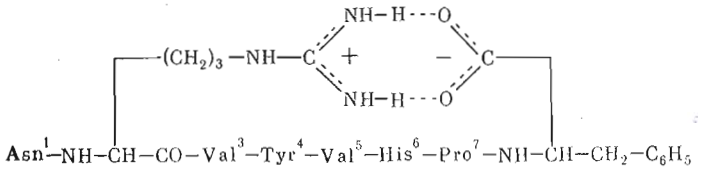
Согласно модели, предусматривающей наличие β-изгиба в N-концевой части молекулы ангиотензина со сближенными боковыми цепями аминокислот в положениях 1 и 5, синтезирован циклоаналог [Gly¹, Glu⁵]ангиотензина с замыканием пептидной связи между γ-карбоксильной группой глутаминовой кислоты и α-аминогруппой глицина. И линейный предшественник, и циклоаналог ангиотензина показывают на несколько порядков более низкую миотропную и прессорную активность в опытах in vitro и in vivo. Сделан вывод о несоответствии данной модели и «биологически активной» конформации ангиотензина в N-концевой половине молекулы.

Широко развернутые физико-химические исследования по установлению пространственной структуры ангиотензина, послужившие основой для постулирования ряда его конформационных моделей [1—4], к настоящему времени привели лишь к одному достаточно обоснованному выводу: в растворах молекулы этого гормона существуют в виде нескольких равновесных форм конформеров [5—9]. В пользу этого вывода свидетельствуют также результаты теоретического конформационного анализа [10—13]. Динамичность структуры низкомолекулярных пептидов, сосуществование в растворе нескольких конформеров с близкими энергетическими характеристиками позволяют полагать, что пространственная структура этих соединений может изменяться и при их переходе из водного раствора в менее полярную биофазу рецептора (прежде всего благодаря дегидратации ионогенных группировок), и при комплексообразовании с рецептором. Одним из возможных путей установления «биологически активной» конформации пептидов является синтез модельных соединений с фиксированной посредством ковалентных связей пространственной структурой. Плодотворность такого подхода иллюстрируется синтезом и исследованием биологических свойств циклических аналогов брадикинина [14].

Полуэмпирический тотальный конформационный анализ молекулы [Asp¹, Val⁵]ангиотензина (ангиотензинамида), выполненный в вакуумном приближении, показал [15], что, как и в случае брадикинина [16], наиболее устойчивы квазициклические структуры ангиотензина, дополнительно стабилизированные внутримолекулярной ионной связью между гуанидиновой группой аргинина в положении 2 и С-концевой карбоксильной

Принятые сокращения: ДЦГК — дициклогексилкарбодиимид, OPf — пентафторфениловый эфир, ДМФА — диметилформамид, ДМСО — диметилсульфоксид.

группой:



Однако синтезированные циклические (укороченные) аналоги ангиотензина, в которых предполагаемая ионная связь между 2-м и 8-м остатками (связь типа 2—8) была заменена ковалентной связью, например

Lys^2-Val^3-Tyr^4-Val^5-His^6-Pro^7-Phe^8—
cyclo(2$^\varepsilon$—8) [*des*-Asp^1, Lys^2]ангиотензин,

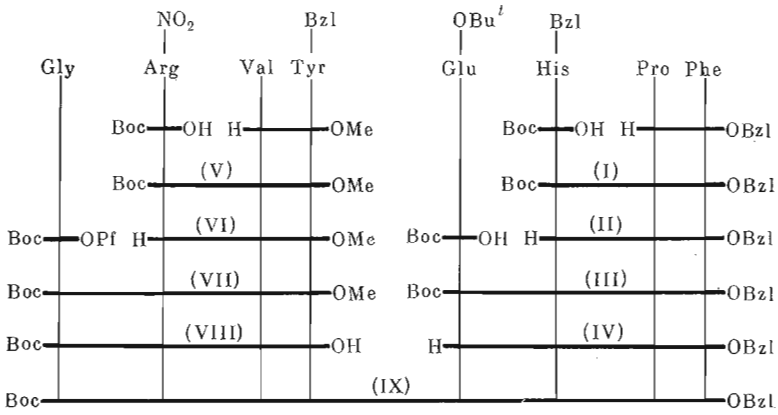
Orn^2-Val^3-Tyr^4-Val^5-His^6-Pro^7-Phe^8-Gly^9 —
cyclo(2$^\delta$—8) [*des*-Asp^1, Orn^2, (Phe-Gly)^8]ангиотензин,

оказались биологически малоактивными соединениями, спектры кругового дихроизма которых значительно отличаются от таковых для линейных предшественников. С другой стороны, заслуживает внимания тот факт, что оба циклоаналога ангиотензина сохраняют способность к 100% связыванию со специфическими антителами, полученными к линейному ангиотензинамиду. Кривые связывания ангиотензинамида и его циклоаналогов параллельны [14].

Продолжая синтез и исследование циклоаналогов ангиотензина, содержащих связь типа 2—8, мы начали поиски других, также возможных «биологически активных» пространственных структур этого гормона, учитывая, что квазициклическая структура, образовавшаяся в биофазе рецептора, может далее изменяться при непосредственном взаимодействии с клеточными рецепторами. Ранее нами для ангиотензина была предложена модель так называемых гидрофобных торов [17], предусматривающая максимальное число контактов гидрофобных боковых групп аминокислот и учитывающая экспериментальные данные [18] о наличии элементов β-структуры в молекуле. В литературе описана модель так называемой масляной капли ангиотензина [19], построенная на основе аналогичных соображений, однако отличительной чертой нашей модели является сближение в пространстве боковых цепей аминокислот в положениях 1 и 5. Для проверки модели гидрофобных торов нами синтезирован новый циклический аналог ангиотензина, в котором ковалентной связью фиксированы аминокислоты в положениях 1 и 5, — *cyclo*(1—5^1) [Gly^1, Gly^2]ангиотензин (XVI).

Исходным соединением для синтеза нового циклоаналога ангиотензина является защищенный октапептид (IX), из которого также получены 3 линейных аналога ангиотензина (XIII—XV) (см. схему).

Октапептид (IX) синтезирован конденсацией тетрапептидов (IV) и (VIII), полученных ступенчатым наращиванием пептидной цепи с N-конца. В качестве конденсирующего агента использован N,N′-дициклогексилкарбодиимид, а также дициклокарбодиимид с добавкой пентафторфенола (при сшивании блоков, циклизации и присоединении Boc-N^G-нитроаргинина) [20]. Boc-группа селективно отщеплялась при помощи *n*-толуолсульфокислоты [21]. Очистку аналогов (XIII—XVI) проводили ионообменной хроматографией на карбоксиметилцеллюлозе в градиенте концентраций водного раствора ацетата аммония. Циклический аналог, кроме того, дополнительно очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-15 в 0,1 М уксусной кислоте для отделения от полимерных соединений и димера. Циклический аналог оказался устойчивым к действию трипсина в отличие от линейного предшественника (XV), который, как и следовало ожидать, образовывал два продукта расщепления.



$$R_1\text{-Gly-Arg-Val-Tyr-Glu-His-Pro-Phe-}R_6$$

(X) R_1=H, R_2=NO_2, R_3=R_5=Bzl, R_4=OBu^t, R_6=OBzl
(XI) R_1=H, R_2=NO_2, R_3=R_5=Bzl, R_4=OH, R_6=OBzl
(XIII) R_1=Boc, R_2=R_3=R_5=H, R_4=OBu^t, R_6=OH
(XIV) R_1=R_2=R_3=R_5=H, R_4=OBu^t, R_6=OH
(XV) R_1=R_2=R_3=R_5=H, R_4=R_6=OH

$$\text{Gly-Arg-Val-Tyr-Glu-His-Pro-Phe-}R_6$$

(XII) R_2=NO_2, R_3=R_5=Bzl, R_6=OBzl
(XVI) R_2=R_3=R_5=H, R_6=OH

Спектры кругового дихроизма линейных аналогов (XIII, XV) в водном растворе (рис. 1) в области 190—197 нм показывают более выраженную отрицательную полосу, чем спектры ангиотензинамида и циклического аналога (XVI). Сильная отрицательная полоса при 197 нм характерна для полиглутаминовой кислоты при pH 7,6, когда ее структура не упорядочена [22]. Рассмотрение этой области спектров свидетельствует, что замена остатка валина в положении 5 на остаток глутаминовой кислоты или ее γ-эфира приводит к дестабилизации пространственной структуры молекулы.

Отрицательная полоса при 225 нм, имеющаяся у ангиотензинамида, у исследованных аналогов также проявляется в виде плеча. По абсолютному значению она даже несколько более интенсивная, однако это не говорит о том, что в аналогах имеется больший сегмент с β-структурой по

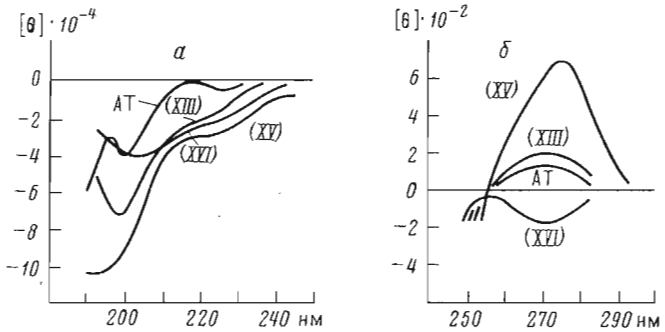


Рис. 1. Спектры КД аналогов ангиотензина (XIII, XV и XVI) и ангиотензинамида (АТ) в воде при pH 6,5 в коротковолновой (*а*) и длинноволновой (*б*) УФ-области

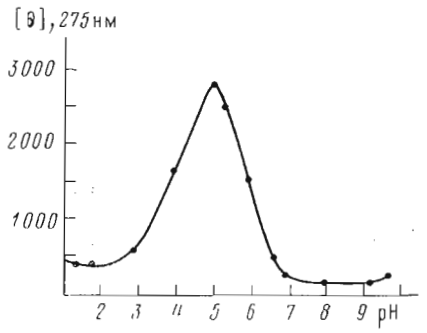


Рис. 2

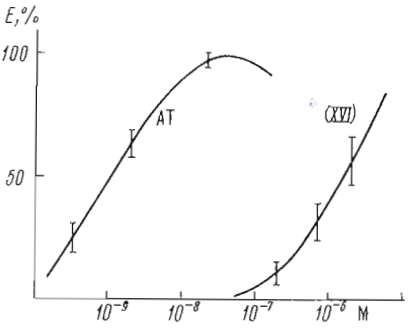


Рис. 3

Рис. 2. Молярная эллиптичность аналога (XV) при 275 нм в зависимости от pH его водного раствора

Рис. 3. Кумулятивные кривые «концентрация – эффект» ангиотензинамида (АТ) и циклоаналога (XVI) в опытах на изолированной colon ascendens крысы. Стандартная ошибка определена при p 0,05

сравнению с ангиотензинамидом, так как полностью отсутствует вторая характерная для β-структуры положительная полоса при 195—198 нм [18].

Небольшие различия кривых КД проявляются в длинноволновой области спектра при 275 нм. Если у линейных аналогов и у ангиотензинамида молярная эллиптичность положительная, то у циклического аналога она отрицательная. Следует отметить, что отрицательной эллиптичностью при 275 нм также обладают водные растворы и некоторых линейных аналогов ангиотензина с модификациями вблизи остатка тирозина, например [Pro^3]ангиотензина и [Ala^6]ангиотензина [23]. Вероятно, в этой области на вид спектра очень сильно влияют даже незначительные конформационные изменения самого тирозина или его окружения.

При титровании [Gly^1, Glu^5]ангиотензина в спектрах КД наблюдаются резкие изменения интенсивности сигнала при 275 нм в зависимости от pH (рис. 2), что свидетельствует о влиянии ионизируемых групп, расположенных вблизи остатка тирозина, на спектральные свойства хромофора тирозина и конформационное состояние молекулы в целом. Из кривой титрования следует, что таких групп две: с p$K \approx 6$ и p$K \approx 4$. Этим значениям соответствуют pK имидазольной группы гистидина (pK 6,25—6,50 [23]) и γ-карбоксильной группы глутаминовой кислоты. Последняя сходна в химическом отношении с β-карбоксильной группой ацетилангиотензина, для которой pK 4 [24]. Примерно такая же, только менее выраженная зависимость эллиптичности от pH проявляется и в другой области поглощения тирозина — при 225 нм ($\Delta[\theta]_{225}$ 500 при изменении pH среды от 3 до 5). При pH 5 наблюдается максимальная эллиптичность, которая может быть обусловлена наибольшей степенью ионизации групп боковых цепей гистидина и глутаминовой кислоты и, следовательно, наибольшей электрической анизотропией в центральной части молекулы.

Учитывая неоднозначность интерпретации спектров КД, связанную с перекрыванием полос хромофоров и наличием смеси конформеров в исследуемых растворах, из сравнительной оценки спектров все же можно сделать вывод, что конформация циклического аналога, особенно центральной части молекулы, в водной среде отличается от конформации ангиотензина.

Прессорная активность аналогов проверена на интактных наркотизированных крысах. При сравнении с действием ангиотензинамида она составляет для линейных аналогов (XIII, XIV, XV) соответственно 0,3; 3 и 0,3%, а для циклического аналога (XVI) около 0,001% от активности ангиотензинамида. Влияние на прессорный эффект ангиотензинамида у циклического аналога отсутствует. Далее циклический аналог был испытан на миотропную активность в опытах на изолированной colon ascendens крыс (рис. 3).

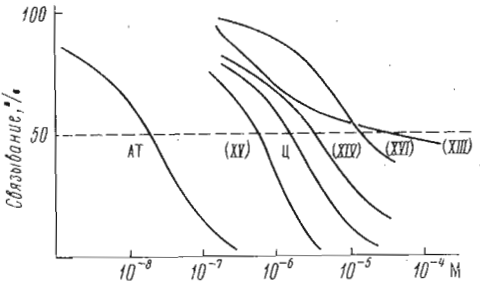


Рис. 4. Иммунохимическая связывающая активность аналогов ангиотензина (XIII—XVI) с антителами, специфическими к ангиотензинамиду (АТ). Ц – кривая для циклического гептапептида *cyclo* (2ε—8)[*des*-Asp¹, Lys²]ангиотензина

Его кумулятивная кривая «концентрация — эффект» параллельна кривой для ангиотензинамида, но сдвинута на три порядка в сторону более высоких концентраций (для циклического аналога pD_2 5,90±0,10, а для ангиотензинамида pD_2 8,96±0,09). На миотропный эффект ангиотензинамида циклический аналог влияния не оказывает.

Результаты исследования иммунологической активности синтезированных соединений показали (рис. 4), что и линейные, и циклический аналоги ангиотензина взаимодействуют с антителами, полученными к комплексу ангиотензинамида с альбумином. Наиболее высокую активность показывают линейные аналоги (XIV и XV). Важно отметить, что кривые связывания большинства линейных и циклического аналогов параллельны кривой ангиотензинамида. Однако в данном случае взаимодействие аналогов с антителами определяется, по-видимому, в большей степени первичной, чем пространственной, структурой, так как параллельную кривую имеет также циклический аналог ангиотензина с пространственной структурой, фиксированной посредством ковалентной связи между остатками аминокислот в положениях 2 и 8. Причиной этого может быть гетерогенность антител и изменение конформации молекул ангиотензина при их комплексировании с альбумином. Не исключено, что при получении антигена для иммунизации животных в зависимости от точки связывания ангиотензина в глобуле альбумина и от химического окружения этой точки различные молекулы ангиотензина могут принимать весьма различные пространственные структуры. Другими словами, на поверхности молекулы альбумина существует множество различных пространственных структур ангиотензина, стабилизированных слабыми связями между боковыми цепями аминокислотных остатков ангиотензина и альбумина.

Таким образом, исследование биологических свойств, особенно миотропной и прессорной активности синтезированных модельных соединений показывает, что N-концевая половина молекулы ангиотензина в комплексе с рецептором имеет иную пространственную структуру, чем это предусматривает модель так называемых гидрофобных торов.

Экспериментальная часть

Синтез пептидов. Температуры плавления промежуточных продуктов определяли в открытых капиллярах без поправки, конечных продуктов (XIII—XVI) — на приборе «Mettler FP5» (Швейцария) при скорости нагревания 2° С/мин. Углы оптического вращения измеряли на поляриметре «Perkin-Elmer 141» (США) при 20° С. Спектры КД получали на дихрографе «Jobin Yvon III» (Франция). При упаривании растворителей в вакууме избегали нагревания выше 40° С. При получении соединений (I, III, V, IX) после реакции конденсации органическую фазу последовательно промывали 0,1 М водным раствором серной кислоты, водой, 1 М раствором бикарбоната натрия, водой, сушили добавлением безводного сульфата натрия и упаривали в вакууме. Перед определением выхода реакции вещества высушивали в вакууме до постоянного веса над пятиокисью фосфора и гидроокисью натрия. ТСХ проводили на пластинках «Silufol» (ЧССР) в

5 системах: 1) этилацетат; 2) хлороформ — метанол — уксусная кислота 85:10:5 (по объему); 3) *н*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1; 4) *втор*-бутанол — 10% водный аммиак, 85:15; 5) *н*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 15:3:10:6. Приведенные значения R_f в системе 3 определяли через сутки после ее приготовления. Электрофорез на бумаге проводили в течение 1 ч в 1 М растворе уксусной кислоты при градиенте напряжения 20 В/см. Гидролиз пептидов для анализа аминокислотного состава осуществляли в 6 М соляной кислоте при 110° С в течение 24 ч.

Бензиловый эфир Boc-N^{im}-бензилгистидил-пролил-фенилаланина (*I*). 3 г (6,9 ммоль) бромгидрата бензилового эфира пролилфенилаланина [25] суспендировали в 20 мл этилацетата и добавляли 10 мл 1 М водного раствора карбоната натрия. Суспензию перемешивали до растворения осадка, органический слой промывали водой (2×10 мл), сушили сульфатом натрия и упаривали в вакууме.

Маслообразный остаток (2,5 г) бензилового эфира пролилфенилаланина (R_f 0,75 (3), желтое пятно при проявлении нингидрином при 70° С) растворяли в 8 мл хлористого метилена, добавляли раствор 1,44 г (6,7 ммоль) Boc-N^{im}-бензилгистидина в 6 мл ДМФА и при −5° С 1,38 г (6,7 ммоль) ДЦГК. Смесь оставляли на ночь при 0° С. Отфильтровывали выпавший осадок дициклогексилкарбамида, фильтрат упаривали в вакууме и остаток растворяли в 30 мл этилацетата. После промывок и упаривания маслообразное вещество растирали с петролейным эфиром и выдерживали в вакууме до затвердевания вспененной массы. Выход защищенного трипептида (I) 3,94 г (76% из расчета на бромгидрат эфира дипептида), т. пл. 60° С, $[\alpha]_D$ −26,1° (*с* 2, этанол). Найдено, %: С 68,43, Н 6,65, N 10,02. $C_{39}H_{45}N_5O_6$ (679,82). Вычислено, %: С 68,91, Н 6,67, N 10,30.

Дихлоргидрат бензилового эфира N^{im}-бензилгистидил-пролил-фенилаланина (*II*). 3,67 г (5,4 ммоль) эфира Boc-трипептида (I) растворяли в 10 мл этилацетата и при 0° С добавляли 30 мл 1 М раствора хлористого водорода в этилацетате. Смесь выдерживали 1 ч при комнатной температуре и 0,5 ч при 0° С. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром. После высушивания на воздухе выход дихлоргидрата эфира трипептида (II) 2,87 г (81%), т. пл. 180—185° С. После перекристаллизации из этанола т. пл. 195—197° С, R_f 0,5 (3), $[\alpha]_D$ −14,0° (*с* 2, ДМФА). Найдено, %: С 62,09, Н 6,01, N 10,80. $C_{34}H_{39}N_5O_4Cl_2$ (652,63). Вычислено, %: С 62,58, Н 6,01, N 10,73.

Бензиловый эфир Boc-O^{e}-трет-бутилглутамил-N^{im}-бензилгистидил-пролил-фенилаланина (*III*). 2,81 г (4,3 ммоль) дигидрохлорида эфира трипептида (II) перевели в свободное основание обработкой карбонатом натрия (как описано при получении соединения (I)). Маслообразный бензиловый эфир N^{im}-бензилгистидил-пролил-фенилаланина (2,5 г) растворяли в 10 мл хлористого метилена, добавляли 1,52 г (5,0 ммоль) γ-*трет*-бутилового эфира Boc-глутаминовой кислоты и при −5° С 1,03 г (5,0 ммоль) ДЦГК. Смесь оставляли на ночь при 0° С. После этого добавляли 0,5 мл уксусной кислоты, выдерживали 0,5 ч и отфильтровывали осадок. После промывок и упаривания фильтрата остаток переосаждали из эфира петролейным эфиром. Выход защищенного тетрапептида (III) 3,37 г (95%), т. пл. 75—80° С, R_f 0,3 (1), $[\alpha]_D$ −34,1° (*с* 2, этанол). Найдено, %: С 66,22, Н 6,99, N 9,90. $C_{18}H_{60}N_6O_9$ (865,05). Вычислено, %: С 66,65, Н 6,99, N 9,72.

Бензиловый эфир O^{e}-трет-бутилглутамил-N^{im}-бензилгистидил-пролил-фенилаланина (*IV*). 3,20 г (3,7 ммоль) эфира Boc-трипептида (III) растворяли в 40 мл этанола, добавляли 1,52 г (8 ммоль) гидрата *п*-толуолсульфокислоты, упаривали в вакууме растворитель до объема 10 мл (в течение 15 мин) и смесь оставляли на 2 ч при 20° С. Остатки растворителя удаляли в вакууме, добавляли 30 мл воды и непрореагировавший эфир Boc-трипептида экстрагировали этилацетатом (3×10 мл). К водному раствору добавляли 1 М раствор карбоната натрия до pH 9,0. Выпавшее масло экстра-

гировали этилацетатом (3×20 мл), этилацетатный раствор промывали водой (2×15 мл), сушили сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток растирали с 20 мл эфира. Выход аморфного аминотетрапептида (IV) 1,99 г (72%), R_f 0,25 (3). Обработкой образца аминотетрапептида (IV) рассчитанным количеством раствора хлористого водорода в этилацетате получили дихлоргидрат аминотетрапептида с т. пл. 115–118° С (разл.), R_f 0,50 (3). Найдено, %: С 59,73, Н 6,77, N 9,70. $C_{43}H_{54}N_6O_7Cl_2$ (837,85). Вычислено, %: С 61,64, Н 6,50, N 10,03.

Метиловый эфир Вос-N^G-нитроаргинил-валил-О-бензилтирозина (*V*). 4,41 г (9,1 ммоль) метилового эфира Вос-валил-О-бензилтирозина [26] растворяли в 25 мл 1 М раствора хлористого водорода в этилацетате, выдерживали 2 ч при 40° С, растворитель упаривали и добавляли 30 мл свежего этилацетата. Смесь выдерживали еще 2 ч при 0° С. К образовавшейся суспензии гелеобразного гидрохлорида метилового эфира валил-О-бензилтирозина добавляли 20 мл воды и потом небольшими порциями 1 М раствор карбоната натрия до pH 9,0. Этилацетатный слой промывали водой (2×15 мл), сушили сульфатом натрия и растворитель упаривали в вакууме. Маслообразный остаток метилового эфира валил-О-бензилтирозина (3,2 г) растворяли в 20 мл ДМФА, добавляли 2,71 г (8,5 ммоль) Вос-N^G-нитроаргинина, 1,56 г (8,5 ммоль) пентафторфенола и после их растворения при 0° С 1,75 г (8,5 ммоль) ДЦГК. Смесь оставляли на ночь, отфильтровывали осадок и фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 30 мл этилацетата. После промывок и упаривания полученное сиропообразное вещество растирали с эфиром и выдерживали в вакууме. Выход аморфного защищенного трипептида (V) 4,59 г (83%), т. пл. 100–105° С. После переосаждения из этанола эфиром т. пл. 111–115° С, R_f 0,7 (2), $[\alpha]_D$ –26,0° (*с* 2, этанол). Найдено, %: С 57,69, Н 7,14, N 13,86. $C_{33}H_{47}N_7O_9$ (685,78). Вычислено, %: С 57,80, Н 6,91, N 14,30.

Метиловый эфир N^G-нитроаргинил-валил-О-бензилтирозина (*VI*). 4,25 г (6,2 ммоль) эфира Вос-трипептида (V) растворяли в 30 мл 1 М раствора хлористого водорода в этилацетате и выдерживали 3 ч при 20° С. Растворитель упаривали, к остатку добавляли 15 мл воды и 1 М раствор карбоната натрия до pH 9,0. Выпавший белый осадок отфильтровывали, промывали водой (3×10 мл) и сушили в вакууме. Выход аминотрипептида (VI) 2,93 г (81%), т. пл. 122–125° С, R_f 0,42 (3), $[\alpha]_D$ –8,3° (*с* 2, ДМФА). Найдено, %: С 57,51, Н 7,09, N 16,68. $C_{28}H_{38}N_7O_7$ (584,66). Вычислено: С 57,52, Н 6,55, N 16,77.

Метиловый эфир Вос-глицил-N^G-нитроаргинил-валил-О-бензилтирозина (*VII*). 2,58 г (4,4 ммоль) трипептида (VI) растворяли в 8 мл ДМФА, добавляли 2,73 г (8,0 ммоль) пентафторфенилового эфира Вос-глицина [27] и смесь выдерживали 16 ч при 20° С. Растворитель упаривали и остаток растирали с эфиром (2×15 мл). Выход защищенного тетрапептида (VII) 2,75 г (85%), т. пл. 135–140° С (разл.). После перекристаллизации из эфира т. пл. 160–162° С (разл.), R_f 0,25 (2), 0,85 (5), $[\alpha]_D$ –34,0° (*с* 2, этанол). Найдено, %: С 56,42, Н 6,73, N 15,01. $C_{35}H_{50}N_8O_{10}$ (742,84). Вычислено, %: С 56,59, Н 6,78, N 15,08.

Вос-глицил-N^G-нитроаргинил-валил-О-бензилтирозин (*VIII*). 2,58 г (4,4 ммоль) защищенного тетрапептида (VII) суспендировали в 20 мл диоксана и при перемешивании при 20° С в течение 15 мин по каплям добавляли 4,5 мл 1 н. водного раствора гидроокиси натрия. После растворения вещества добавляли в течение 30 мин 60 мл воды. Потом смесь перемешивали 3 ч при 20° С, добавляли 1 М раствор серной кислоты до pH 7.0 и растворитель упаривали до половины начального объема. К раствору добавляли 20 мл этилацетата и этилацетатный слой экстрагировали 0,1 М раствором бикарбоната натрия (3×15 мл). Объединенные водные фазы подкисляли 1 М раствором серной кислоты до pH 3,0 и выпавшее масло омыленного Вос-тетрапептида экстрагировали этилацетатом (3×15 мл). Этилацетатный слой промывали водой (3×10 мл), сушили сульфатом нат-

рия и упаривали растворитель. Остаток растирали с эфиром. Выход кислоты Вос-тетрапептида (VIII) 1,89 г (76%), т. пл. 115—120° С (разл.). После перекристаллизации из этанола добавлением эфира т. пл. 133—135° С (разл.), R_f 0,77 (3), 0,70 (5), $[\alpha]_D$ 5,0° (*с* 2, ДМФА). Найдено, %: С 55,28, Н 6,76, N 14,97. $C_{34}H_{48}N_6O_{10}$ (728,81). Вычислено, %: С 56,03, Н 6,64, N 15,37.

Бензиловый эфир Вос-глицил-N^G-нитроаргинил-валил-О-бензилтирозил-O^e-трет-бутилглутамин-N^{im}-бензилгистидил-пролил-фенилаланина (*IX*) К раствору, содержащему 1,68 г (2,2 ммоль) С-концевого аминотетрапептида (IV) и 1, 60 г (2,2 ммоль) N-концевого тетрапептида (VIII) в 10 мл ДМФА, при 0° С добавляли раствор, содержащий 2,28 г (3,0 ммоль) комплекса ДЦГК с пентафторфенолом (1 : 3) [20] в 5 мл ДМФА. Смесь оставляли при 0° С на 16 ч, осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме и добавляли 20 мл этилацетата. После промывок и упаривания растворителя остаток растирали с эфиром (2×10 мл). Выход полностью защищенного октапептида (IX) 2,80 г (85%), т. пл. 140—150° С. После перекристаллизации из этанола т. пл. 167—170° С, R_f 0,45 (3), 0,82 (4), $[\alpha]_D$ −19,1° (*с* 2, ДМФА). Найдено, %: С 62,31, Н 6,66, N 13,16. $C_{77}H_{98}N_{14}O_{16}$ (1475,72). Вычислено, %: С 62,67, Н 6,69, N 13,29.

п-Толуолсульфонат бензилового эфира глицил-N^G-нитроаргинил-валил-О-бензилтирозил-O^e-трет-бутилглутамил-N^{im}-бензилгистидил-пролил-фенилаланина (X). 0,4 г (0,27 ммоль) Вос-октапептида (IX) растворяли при 40° С в 10 мл этанола, раствор быстро охлаждали до 20° С и добавляли 0,15 г (0,80 ммоль) гидрата *п*-толуолсульфокислоты. Растворитель упаривали до объема 3,0 мл и смесь оставляли при 20° С на 3 ч. Оставшийся растворитель удаляли и добавляли 10 мл этилацетата и 5 мл воды. Затем смесь подщелачивали до pH 9,0 1 М раствором карбоната натрия. Этилацетатный слой промывали водой (2×5 мл), сушили сульфатом натрия, упаривали растворитель и остаток растирали с эфиром. Выход *п*-толуолсульфоната октапептида (X) 0,28 г, т. пл. 95—100° С (разл.). После перекристаллизации из этанола т. пл. 115—119° С (разл.), R_f 0,30 (3), 0,52 (4), желтое пятно при проявлении нингидрином, $[\alpha]_D$ −19,7° (*с*2, ДМФА).

Бензиловый эфир глицил-N^G-нитроаргинил-валил-О-бензилтирозил-глутамил-N^{im}-бензилгистидил-пролил-фенилаланина (XI). 1,5 г (1,02 ммоль) октапептида (IX) растворяли в 30 мл 1 н. раствора хлористого водорода в ледяной уксусной кислоте и выдерживали 3 ч при 40° С. Растворитель упаривали и к остатку добавляли 10 мл 10% водного раствора ацетата натрия. Выпавший осадок отфильтровывали, растирали его с 5 мл этанола, потом с 10 мл эфира. Выход амфотерного октапептида (XI) 0,8 г (58% из расчета на дигидрат конечного продукта), т. пл. 165° С (размягчение при 146° С), R_f 0,75 (3), 0,50 (4), $[\alpha]_D$ −21,0° (*с* 2, ДМФА). Найдено, %: С 59,78, Н 6,44, N 14,52. $C_{68}H_{82}N_{14}O_{14}\cdot 2H_2O$ (1355,58). Вычислено, %: С 60,25. Н 6,39, N 14,47.

Бензиловый эфир цикло(1—5[1])-1-глицил-N^G-нитроаргинил-валил-О-бензилтирозил-5-глутамил-N^{im}-бензилгистидил-пролил-фенилаланина (XII). 0,5 г (0,37 ммоль) октапептида (XI) растворяли в 300 мл дважды перегнанного в атмосфере азота ДМФА (над гидроокисью бария и потом над нингидрином) и при 0° С в один прием добавляли раствор, содержащий 2,81 г (3,7 ммоль) комплекса ДЦГК с пентафторфенолом (1 : 3) в 200 мл ДМФА. Смесь оставляли на 3 сут при 0° С без доступа света. Растворитель упаривали и остаток растирали с эфиром (2×5 мл). Полученный порошок (0,6 г), содержащий кроме циклопептида (XII) (R_f 0,70 (3), обнаружение хлор-бензидиновым реактивом и в УФ-свете) дициклогексилкарбамид и продукты полимеризации, без очистки использовали для получения аналога (XVI).

[Вос-Gly[1], Glu(OBu[t])[5]]ангиотензин (XIII). 0,2 г (0,14 ммоль) октапептида (IX) растворяли в смеси метанол — уксусная кислота — вода (6 : 1 : 1) и при перемешивании гидрировали 30 ч в слабом токе водорода в присут-

ствии палладиевой черни. После каждых 10 ч гидрирования прибавляли свежую порцию катализатора. Затем катализатор отфильтровывали и фильтрат упаривали. Остаток растворяли в 3 мл смеси метанол — вода (1 : 1) и наносили на колонку (1×3 см), заполненную карбоксиметилцеллюлозой в NH_4^+-форме. Элюировали буферным раствором с линейно возрастающим градиентом концентрации ацетата аммония (400 мл воды+ +400 мл 0,2 М раствора ацетата аммония с pH 6,5). Собирали основную фракцию (согласно абсорбции элюата при 254 нм), которая выходила из колонки при 0,05 М буферном растворе. К фракции добавляли 50 мл этанола, растворитель упаривали, сублимировали ацетат аммония (0,01 мм рт. ст., 40° С, 1 ч) и остаток лиофилизовали из 50% уксусной кислоты. Выход аналога ангиотензина (XIII) 40 мг, т. пл. 175—180° С (разл., размягчение при 159° С), R_f 0,27 (3), E_{Arg} 0,55 (нингидриновая реакция, отрицательная при 70° С, положительная при 150° С, положительные реакции Паули и Сакагучи). Найдено, %: С 54,85, Н 7,23, N 14,24. $C_{56}H_{82}N_{13}O_{14}\cdot C_2H_4O_2\cdot 3H_2O$ (1275,46). Вычислено, %: С 54,62, Н 7,27, N 14,28. В спектре ПМР при 90 МГц имеется пик 18 протонов двух $(CH_3)_3C$-групп (1,33 м.д. в ДМСО-d_6). Анализ аминокислот: Arg 0,9, Glu 1,1, Gly 1,1, His 1,0, Phe 0,8, Pro 0,9, Tyr 0,9, Val 1,0.

[*Gly*^{1}, *Glu(OBu*^{t}*)*^{5}]*ангиотензин (XIV).* 0,2 г октапептида (X) гидрировали и очищали, как при получении соединения (XIII). После обработки основной фракции, выходящей из колонки при достижении 0,08 М раствором ацетата аммония, получали 42 мг аналога (XIV) с т. пл. 185—193° С (разл., размягчение при 173° С), R_f 0,1 (3), E_{Arg} 0,83. Найдено, %: С 53,54, Н 7,21, N 15,33. $C_{51}H_{74}N_{13}O_{12}\cdot C_2H_4O_2\cdot 4H_2O$ (1193,35). Вычислено для ацетата тетрагидрата, %: С 53,34, Н 7,26, N 15,26. Анализ аминокислот: Arg 0,9, Glu 1,1, Gly 1,1, His 0,8, Phe 0,9, Pro 1,0, Tyr 0,9, Val 1,0.

[*Gly*^{1}, *Glu*^{5}]*ангиотензин (XV).* 0,2 г октапептида (XI) гидрировали и очищали, как при получении соединения (XIII). После обработки основной фракции, выходящей из колонки при достижении 0,075 М раствором ацетата аммония, получали 53 мг аналога (XV) с т. пл. 208° С, R_f 0,05 (3), E_{Arg} 0,80. Найдено, %: С 48,47, Н 7,17, N 15,03. $C_{47}H_{66}N_{13}O_{12}\cdot C_2H_4O_2\cdot 8H_2O$ (1207,30). Вычислено для ацетата октагидрата, %: С 48,75, Н 7,01, N 15,08. Анализ аминокислот: Arg 0,9, Glu 1,1, Gly 1,1, His 0,8, Phe 0,7, Pro 0,8, Tyr 0,9, Val 1,0.

Инкубация аналога (XIII) с трипсином (Worthington, США) согласно методике [28] с последующим электрофорезом сконцентрированного раствора показала наличие в растворе двух новых пептидов: с E_{Arg} 0,64 (положительная реакция Паули и нингидриновая) и с E_{Arg} 1,1 (положительная реакция Сакагучи и нингидриновая).

cyclo(1—5^t*)*[*Gly*^{1}, *Glu*^{5}]*ангиотензин (XVI).* 0,3 г продукта, содержащего защищенный циклопептид (XII), гидрировали и разделяли на карбоксиметилцеллюлозе, как при получении соединения (XIII). Основную фракцию, выходящую из колонки при достижении 0,06 М раствором ацетата аммония и дающую положительные реакции Паули и Сакагучи, упаривали до объема 3 мл, наносили на колонку (2×100 см) с сефадексом G-15 и элюировали 0,1 М раствором уксусной кислоты. Получили две фракции, обе они имеют совпадающую электрофоретическую подвижность, E_{Arg} 0,65, и одинаковый аминокислотный анализ, соответствующий аналогу (XVI). Первая фракция (25 мг, R_f 0,07 (3), т. пл. 195—200° С, $[\alpha]_D$ −18° (*c*2, ДМФА) представляет собой димер, а вторая (41 мг, R_f 0,1 (3), т. пл. 202—209° С, $[\alpha]_D$ −21° (*c* 2, ДМФА) — очищенный аналог (XVI).

После инкубации аналога (XVI) с трипсином в таких же условиях, как в случае линейного аналога (XV), в растворе не обнаружили наличия других пептидов, кроме исходного.

Биологические исследования. Влияние аналогов на артериальное давление определяли у крыс весом 180—200 г, наркотизированных уретаном, после внутривенных инъекций растворов (0,1 мл) соединений (XIII—XVI)

в дозах от 0,5 до 500 мкг/кг. Активность вычисляли по четырехточечному методу [29]. Миотропную активность изучали посредством регистрации изотонических сокращений изолированного органа colon ascendens крыс согласно методике [30], использовали модифицированный [31] прибор ВИ6-5МА [32]. Кумулятивные кривые «концентрация — эффект» получали обработкой на ЭВМ данных из 6 опытов.

Иммунохимические исследования. Антигенную активность аналогов ангиотензина определяли по количеству вытесненного ими меченого ангиотензинамида из комплекса его с антителами согласно методике [33]. Для этих целей получали антисыворотку к ангиотензинамиду, комплексированному с альбумином. Использовали разведение антисыворотки 1 : 100, позволяющее связывать в среднем не менее 43% меченого гормона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smeby R. R., Arakawa K., Bumpus F. M., Marsh M. M. (1962) Biochim. et biophys. acta, **58**, 550—557.
2. Weinkam R. J., Jorgensen E. C. (1971) J. Amer. Chem. Soc., **93**, 7033—7038.
3. Printz M. P., Nemethy G., Bleich H. (1972) Nature New Biol., **237**, 135—140.
4. Fermandjian S., Greff D., Fromageot P. (1972) in: Chem. Biol. Pept., Proc. 3-rd Amer. Pept. Symp. (Meienhofer J., ed.), pp. 545—562, Ann. Arbor Sci., Ann Arbor, Mich.
5. Franze de Fernandez M. T., Delius A. E., Paladini A. C. (1968) Biochim. et biophys. acta, **154**, 223—225.
6. Ferreira A. T., Hampe O. G., Paiva A. C. M. (1969) Biochemistry, **8**, 3483—3487.
7. Glickson J. D., Dadok J., Marshall G. R. (1974) Biochemistry, **13**, 11—14.
8. Deslauriers R., Paiva A. C. M., Schaumburg K., Smith I. C. P. (1975) Biochemistry, **14**, 878—886.
9. Greff D., Fermandjian S., Fromageot P., Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M. (1976) Eur. J. Biochem., **61**, 297—305.
10. De Coen J.-L., Ralston E. (1977) Biopolymers, **16**, 1929—1943.
11. Галактионов С. Г., Никифорович Г. В., Чипенс Г. И., Шендерович М. Д. (1979) Ангиотензин, молекулярные механизмы действия, с. 21—77, «Зинатне», Рига.
12. Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. (1979) Биоорган. химия, **5**, 1609—1616.
13. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. (1979) Изв. АН ЛатвССР, Сер. хим., 94—107.
14. Chipens G., Nikiforovich G., Mutulis F. (1980) in: Peptides, Struct. and Biol. Funct., Proc. 6-th Amer. Pept. Sym. (Gross E., Meienhofer J., eds), Pierce Chem. Co., Rockford, III (in press).
15. Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Галактионов С. Г. (1976) Биоорган. химия, **2**, 1268—1270.
16. Галактионов С. Г., Шерман С. А., Шендерович М. Д., Никифорович Г. В., Леонова В. И. (1977) Биоорган. химия, **3**, 1190—1197.
17. Вегнер Р. Э., Чипенс Г. И. (1976) Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 458—460.
18. Fermandjian S., Morgat J.-L., Fromageot P. (1971) Eur. J. Biochem., **24**, 252—258.
19. Glauser S. C., Wagner H., Glauser E. M., Sevy R. W. (1970) Curr. Mod. Biol., **3**, 221—224.
20. Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M. Q. (1967) J. Amer. Chem. Soc., **89**, 183—184.
21. Goodacre J., Ponsford R. J., Stirling I. (1975) Tetrahedron Lett., **42**, 3609—3612.
22. Holzwarth G., Doty P. (1965) J. Amer. Chem. Soc., **87**, 218—228.
23. Lintner K., Fermandjian S., Fromageot P., Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M. (1977) Biochemistry, **16**, 806—812.
24. Juliano L., Laluce C., Oliveira M. C. F., Paiva A. C. M. (1979) Biopolymers, **18**, 1793—1807.
25. Schattenkerk C., Visser G. H., Kerling K. E. T., Havinga E. (1964) Rec. Trav. Chim., **83**, 677—683.
26. Isowa Y., Ohmori M., Sato M., Mori K. (1977) Bull. Chem. Soc. Japan, **50**, 2766—2772.
27. Kisfaludy L., Löw M., Nyéki O., Szirtes T., Schön I. (1973) Liebigs Ann. Chem., 1421—1429.
28. Дэвени Т., Гергей Я. (1976) Аминокислоты, пептиды, белки, с. 168, «Мир», М.
29. Schild H. O. (1942) J. Physiol., **101**, 115—130.
30. Van Rossum J. M. (1963) Arch. Int. Pharmacodyn., **143**, 299—330.
31. Индулен Ю. И., Розенблит А. Б., Клуша В. Е. (1974) Тез. докл. конф. «Вопр. фармакол. нейротропных средств», с. 49, Рига.
32. Беляков Н. В., Семушин Б. В. (1972) Лабор. дело, **10**, 630—632
33. Афанасьева Г. А., Чипенс Г. И. (1977) Биохимия, **42**, 1711—1719.

Поступила в редакцию
3.VI.1980

SYNTHESIS OF ACYCLIC AND CYCLIC ANALOGS OF ANGIOTENSIN MODIFIED IN POSITION 1 AND 5

VEGNER R. E., CHIPENS G. I., GRINSTEINE I. V.,
MYSHLYAKOVA N. V., AFANASIEVA G. A., VOSEKALNA I. A.

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

Based on the model postulating a β-bend in the N-terminal part of angiotensin molecule with closely located side chains of amino acid residues in position 1 and 5, a cyclic analog, [Gly^1, Glu^5]angiotensin, has been synthesized, the carboxyl of glutamic acid and α-amino group of glycine in it being connected by peptide bond. Both the linear precursor and the cyclic analog exhibit a significantly lower (by several orders of magnitude) myotropic and pressor activity in vitro and in vivo. The validity of the above model for the «biologically active» conformation of angiotensin in the N-terminal part of the molecule is questioned.