



УДК 547.964.4.07

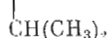
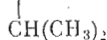
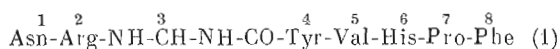
СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА [Asn¹, *aza*-Hva³]- и [Asn¹- *aza*-Hva³, Ile⁸]АНГИОТЕНЗИНА

Анцанс Ю. Е., Макарова Н. А., Чипене Г. П.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Классическими методами пептидной химии синтезированы два новых аналога ангиотензина, содержащие в положении 3 остаток *aza*- α' -гомо-*L*-валина, и исследована их прессорная и миотропная активность. Показано, что [Asn¹, *aza*-Hva³]ангиотензин является парциальным агонистом природного гормона с сильно выраженной антагонистической активностью (pA_2 $9,2 \pm 0,4$, colon ascendens крысы). Еще более сильным антагонистом ангиотензина является [Asn¹, *aza*-Hva³, Ile⁸]ангиотензин (pA_2 $9,7 \pm 0,2$), который практически лишен внутренней активности природного гормона.

В продолжение исследований в ряду *aza*-аналогов ангиотензина [1, 2] нами синтезированы два новых соединения: [Asn¹, *aza*-Hva³]ангиотензин (1) и [Asn¹, *aza*-Hva³, Ile⁸]ангиотензин (2):



и исследована их прессорная и миотропная активность, а также их антагонистические свойства относительно природного гормона.

Соединение (1) получено методом фрагментной конденсации согласно схеме. На основе той же схемы, используя в качестве С-концевого тетрапептида *n*-нитробензиловый эфир валил-гистидил-пролил-изолейцина [3], синтезировали изолейциновый аналог (2). Синтез промежуточных соединений (3)–(6) и (9)–(11) проведен согласно описанным в литературе методикам [3–6]. Азид (7), полученный по методу Рудингера из гидразида (6), выдерживали в растворе диметилформаида 1 ч при 50° С. В таких условиях азид полностью перегруппировался в изоцианат (8), который без выделения вводили в реакцию с соединением (15). Защитные группы у полученного октапептида (16) и его изолейцинового аналога удаляли каталитическим гидрогенолизом. Ацетат аспарагирил-аргинил-аза- α' -гомовалил-тирозил-валил-гистидил-пролил-фенилаланина (1) очищали экстракцией *n*-бутанолом из водного раствора, а его изолейциновый аналог, соединение (2), – ионообменной хроматографией на СМ-целлюлозе.

Сокращения: ангиотензин – [Asn¹, Val⁸]ангиотензин II; *aza*-гсмовалин (*aza*-Hva) – остаток *aza*- α' -гомовалина; ДМФА – диметилформаид; ONb – *n*-нитробензиловый эфир; ONp – *n*-нитрофениловый эфир.

взаимодействует со специфическими по отношению к ангиотензину анти-телами [9].

Наличие «двойного» антагонизма (*aza*-аналог — ангиотензин, [Phe⁸]ангиотензин — *aza*-аналог) и другие приведенные выше данные свидетельствуют о том, что вновь синтезированный аналог (1) действует на специфические для ангиотензина клеточные рецепторы и обладает высоким сродством, но пониженной агонистической активностью. Таким образом, нами впервые получен новый тип антагониста ангиотензина, не модифицированный в положении 8 и имеющий высокое значение коэффициента рA₂. Тотальный полуэмпирический расчет пространственных структур *aza*-аналога (1) показал, что они весьма сходны с таковыми для ангиотензина [10].

Антагонисты ангиотензина вызывают определенный интерес с точки зрения практической медицины — для создания новых средств диагностики некоторых форм гипертонической болезни [11–13]. Некоторые антагонисты ангиотензина, например саралазин, уже применяются для этих целей в клиниках [14–16]. Необходимой предпосылкой их успешного использования является полное отсутствие агонистических свойств природного гормона [17, 18]. Поэтому нами был синтезирован новый аналог ангиотензина, содержащий двойную модификацию — [Asn¹, *aza*-Hva³, Phe⁸]-ангиотензин (2). Аналог (2) не обладает миотропной активностью, а его прессорная реакция в опытах *in vivo* понижена в 10 раз по сравнению с [Phe⁸]ангиотензином и составляет лишь 0,1–0,2% от прессорной активности природного гормона.

Таким образом, соединение (2) является еще более сильным антагонистом, чем аналог (1) или [Phe⁸]ангиотензин (рA₂ соответственно 9,7±0,2; 9,2±0,4; 8,2±0,1). Так, например, при концентрациях 10⁻¹⁰–10⁻⁵ М соединение (2) на изолированной *colon ascendens* крысы миотропной реакции не проявляет, но действует как сильный антагонист ангиотензина. То же самое наблюдается в условиях *in vivo*. Для получения эквивалентной ответной реакции на ангиотензин после инъекции аналога (2) крысам в дозах 50 и 100 мкг/кг требуется соответственно 10- и 100-кратное увеличение дозы ангиотензина. Инфузия антагониста крысам со скоростью 10 и 100 мкг/кг/мин перемещает кривую «концентрация — эффект» в сторону высших концентраций соответственно на один и два порядка.

Синтезированные соединения (1) и (2) можно отнести к конформационным аналогам ангиотензина и его [Phe⁸]аналога с увеличенной конформационной свободой молекулы [19], что, как показано в настоящей работе, приводит к существенному изменению и дифференциации биологических свойств ангиотензина. Таким образом, применение «*aza*-модификации» может быть полезным при создании новых аналогов олигопептидов с определенными фармакологическими свойствами, а также при исследовании механизма действия пептидных гормонов и их «биологически активных» конформаций [10].

Экспериментальная часть

Температуру плавления (или разложения) 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 30% уксусной кислоте, рН 1,9, при 18 В/см; электрофоретическая подвижность соединений приведена по отношению к гистидину (E_{HIS}). Для нисходящей хроматографии применяли бумагу FN-3 (ГДР) и следующие системы: *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 30 : 20 : 6 : 24 (А); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 5 : 1 : 2 (В). ТСХ проводили на пластинках «Silufol» (Kavalier, Чехословакия) в системах: этилацетат — пиридин — уксусная

кислота — вода, 5 : 5 : 1 : 3 (В); хлороформ — метанол — вода, 40 : 30 : 5 (Г); *n*-бутанол — изопропанол — вода — хлоруксусная кислота, 65 : 15 : 20 : 3 (Д); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (Е); хлороформ — этанол — этилацетат — вода, 5 : 5 : 1,5 : 0,5 (Ж). Вещества на хромато- и электрофореграммах в зависимости от структуры соединения обнаруживали нингидрином и реактивами Паули, Сакагучи, Рейнделя-Хоппе и Бартона. Для элементного анализа вещества высушивали в пистолете Фишера в течение 24 ч над P_2O_5 при $60^\circ C$ и остаточном давлении 0,1 мм рт. ст. Кислотный гидролиз пептидов проводили 6 н. соляной кислотой при $105^\circ C$ в запаянных ампулах в течение 24 ч. Аминокислотный состав определяли на автоматическом анализаторе ВС-200 (Biocal, ФРГ). Миотропные свойства соединений (1) и (2) в опытах *in vitro* изучали, согласно описанной методике [7], регистрацией изотонических сокращений восходящей ободшной кишки (colon ascendens) крыс, являющейся наиболее чувствительным тест-органом для исследования миотропной активности ангиотензина.

Антагонистические свойства изучены в диапазоне концентраций 10^{-10} — 10^{-5} М, время предварительной экспозиции кишки с исследуемым соединением составило 3 мин. При вычислении кумулятивных кривых «концентрация — эффект» (КККЭ) применена машинная обработка экспериментальных данных (каждая точка определялась как средняя из 6—10 опытов) с определением доверительных интервалов при P 0,05.

Для количественной характеристики конкурентного антагонизма соединений (1) и (2) вычислены параметры pA_2 .

В опытах *in vivo* регистрировали кровяное давление у наркотизированных крыс. После предварительной (1 мин) инъекции исследуемого соединения в дозах 10, 50, 100, 250 и 500 мкг/кг животным вводили ангиотензинамид в стандартных дозах 0,05; 0,5; 5,0 и 25 мкг/кг. Антагонизм соединения (2) исследован также при инфузионном его введении 10 и 100 мкг/кг/мин в течение 20 мин.

1. *n*-Нитробензиловый эфир трет-бутилоксикарбонил-*O*-бензилтирозил-валил-гистидил-пролил-фенилаланина (14). К раствору 6,3 г (10 ммоль) *n*-нитробензилового эфира валил-гистидил-пролил-фенилаланина (13) в 50 мл ДМФА прибавляли 6 г (12 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира трет-бутилоксикарбонил-*O*-бензилтирозина (12), 0,5 г 1-оксибензотриазола и выдерживали 15 ч при $20^\circ C$. Реакционную смесь выливали в 400 мл этилацетата и промывали последовательно 15% раствором $KHSO_4$, водой, 10% $NaHCO_3$, водой и высушивали над $MgSO_4$. Растворитель упаривали до объема 50 мл и соединение (14) высаживали в виде аморфного вещества смесью эфир — гексан (1 : 1). Выход 8,2 г (83%); т. пл. 130 — $135^\circ C$; R_f 0,81 (Г), 0,62 (Д). Найдено, %: С 64,11; Н 6,42; N 10,83. $C_{53}H_{62}N_8O_{11}$. Вычислено, %: С 64,49; Н 6,33; N 11,35.

2. Дихлоргидрат *n*-нитробензилового эфира *O*-бензилтирозил-валил-гистидил-пролил-фенилаланина (15). 8 г (8,1 ммоль) соединения (14) растворяли в 50 мл ледяной уксусной кислоты, прибавляли 50 мл 2 н. раствора HCl в уксусной кислоте, выдерживали 15 мин при $20^\circ C$, упаривали при $30^\circ C$, остаток растирали с эфиром, отфильтровывали и высушивали над KOH/P_2O_5 . Выход 7,5 г (96%); т. пл. 142 — $146^\circ C$; E_{HIS} 0,66 (рН 2,4); R_f 0,28 (Д). Найдено, %: С 59,76; Н 5,81; N 11,14. $C_{48}H_{54}N_8O_9 \cdot 2HCl$. Вычислено, %: С 60,06; Н 5,88; N 11,63.

3. *n*-Нитробензиловый эфир трет-бутилоксикарбонил-*O*-бензилтирозил-валил-гистидил-пролил-изолейцина получали из *n*-нитробензилового эфира валил-гистидил-пролил-изолейцина и *n*-нитрофенилового эфира трет-бутилоксикарбонил-*O*-бензилтирозина согласно методике 1. Выход 76%; т. пл. 106 — $109^\circ C$, $[\alpha]_D^{22}$ -24° (с 1, ДМФА); R_f 0,78 (Г), 0,57 (Д). Найдено, %: С 63,24; Н 6,82; N 11,14. $C_{50}H_{64}N_8O_{11}$. Вычислено, %: С 63,01; Н 6,77; N 11,76.

4. Дихлоргидрат *n*-нитробензилового эфира *O*-бензилтирозил-валил-гистидил-пролил-изолейцина получали согласно методике 2. Выход 96%; т. пл. 138–140° С, $[\alpha]_D^{22} -19,9^\circ$ (с 1, ДМФА); E_{HIS} 0,66 (рН 2,4); R_f 0,25 (Д). Найдено, %: С 58,49; Н 6,22; N 12,48. $C_{15}H_{16}N_2O_9 \cdot 2HCl$. Вычислено, %: С 58,37; Н 6,31; N 12,01.

5. *n*-Нитробензиловый эфир бензилоксикарбонил-аспарагинил-*N*^α-нитроаргинил-аза-α'-гомовалил-*O*-бензилтирозил - валил - гистидил - пролил-фенилаланина (16). К раствору 2,43 г (3,5 ммоль) соединения (6) в 15 мл ДМФА прибавляли 2 мл (14 ммоль) 7 н. раствора HCl в диоксане, реакционную смесь охлаждали до -20° С, прибавляли 0,55 мл (4 ммоль) трет-бутилнитрита, выдерживали 20 мин при -15° С и выливали в 200 мл охлажденного до -5° С насыщенного раствора NaCl. (При дальнейшей обработке температуру раствора азида поддерживали не выше 3° С.) Азид (5) экстрагировали этилацетатом (2×200 мл), промывали последовательно водой, 5% раствором NaHCO₃, водой, высушивали над Na₂SO₄ (10 мин) и упаривали досуха в вакууме (5° С, 0,1 мм рт. ст.). Остаток растворяли в 30 мл ДМФА. 15 мин встряхивали с размельченными молекулярными ситами А5 (2 г), отфильтровывали и фильтрат выдерживали 1 ч при 50° С (в течение первых 15–20 мин выделяются пузырьки азота). Полученный раствор изонаната (8) прибавляли к раствору 2,23 г (2 ммоль) дифторацетата *n*-нитробензилового эфира *O*-бензилтирозил-валил-гистидил-пролил-фенилаланина (14) и 0,55 мл (4 ммоль) триэтиламина в 12 мл ДМФА и выдерживали 15 ч при 18° С. Реакционную смесь выливали в 200 мл воды, объемистый осадок отфильтровывали, промывали последовательно 5% раствором NaHCO₃, водой, 5% раствором KHSO₄, водой. Влажный продукт суспендировали в 250 мл этилацетата, отфильтровывали, промывали этанолом (80 мл), высушивали и переосаждали из систем ДМФА – этанол и ДМФА – вода. Высушивали в вакууме над P₂O₅/KOH. Выход 1,92 г (62%), считая на аминокомпонент, т. пл. 186–190° С (разл.); $[\alpha]_D^{22} -38^\circ$ (с 0,5, ДМФА); R_f 0,93 (А), 0,95 (Б), 0,95 (В), 0,83 (Г), 0,81 (Д), 0,83 (З); E_{HIS} 0,48 (рН 1,9). Найдено, %: С 58,71; Н 5,47; N 16,13. $C_{71}H_{87}N_{17}O_{17}$. Вычислено, %: С 59,03; Н 5,65; N 16,48.

6. *n*-Нитробензиловый эфир бензилоксикарбонил-*N*^α-нитроаргинил-аза-α'-гомовалил-*O*-бензилтирозил-валил-гистидил-пролил-изолейцина получали согласно методике 5. Выход 53%, считая на аминокомпонент, т. пл. 193–195° С; $[\alpha]_D^{22} -22^\circ$ (с 1, ДМФА); R_f 0,90 (А), 0,93 (Б), 0,62 (Г); E_{HIS} 0,48 (рН 1,9). Найдено, %: С 57,94; Н 5,96; N 17,14. $C_{68}H_{89}N_{17}O_{17}$. Вычислено, %: С 57,66; Н 6,33; N 16,81.

7. Аспарагинил-аргинил-аза-α'-гомовалил-тирозил-валил-гистидил-пролил-фенилаланин (1). К раствору 1,8 г (1,24 ммоль) соединения (16) в 40 мл смеси метанол – уксусная кислота – вода (6 : 1 : 1) прибавляли 1 г палладиевой черни и гидрировали 24 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали до объема 5 мл, приливали 50 мл абсолютного этанола и снова упаривали до объема 5 мл. Упаривание этанолом повторяли еще 3 раза, закристаллизовавшийся продукт отфильтровывали, промывали этанолом и эфиром. Полученное вещество растворяли в 100 мл воды и после насыщения раствора *n*-бутанолом промывали *n*-бутанолом (2×5 мл), затем октапептид (1) экстрагировали *n*-бутанолом (3×150 мл). Объединенные экстракты упаривали в вакууме (30° С, 12 мм рт. ст.) до объема 15 мл, остаток растирали с этанолом, осадок отфильтровывали и высушивали в вакууме над P₂O₅/KOH при 60° С. Выход 1,1 г (80%), т. пл. 220–230° С (разл.); $[\alpha]_D^{22} -44,8^\circ$ (с 0,5; H₂O); R_f 0,22 (А), 0,11 (Б); E_{HIS} 0,79 (рН 2,4). Найдено, %: С 55,14; Н 7,08; N 19,04. $C_{49}H_{71}N_{15}O_{11} \cdot CH_3COOH$. Вычислено, %: С 55,37; Н 6,83; N 18,99.

8. Аспарагинил-аргинил-аза-α'-гомовалил-тирозил-валил-гистидил-тирозил-изолейцин (2) получали согласно методике 7. Выход 84%; т. пл. 195–197° С; $[\alpha]_D^{22} -57,9^\circ$ (с 1; 1 н. CH₃COOH); R_f 0,24 (А), 0,12 (Б); E_{HIS} 0,75 (рН 2,4). Найдено, %: С 50,76; Н 6,99; N 18,64. $C_{48}H_{73}N_{15}O_{11} \cdot CH_3COOH$. Вычислено, %: С 51,19; Н 7,43; N 18,65.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анцанс Ю. Е., Чипенс Г. И. (1975) Биоорган. химия, **1**, 1410—1417.
2. Анцанс Ю. Е., Макарова Н. А., Мисня И. П., Чипенс Г. И. (1979) Биоорган. химия **5**, 1295—1301.
3. Анцанс Ю. Е., Чипенс Г. И. (1978) Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 89—93.
4. Schwarz H., Bumpus F. M., Page J. H. (1957) J. Amer. Chem. Soc., **79**, 5697—5703.
5. Анцанс Ю. Е., Берга Д. А., Макарова Н. А., Чипенс Г. И. (1980) Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 595—600.
6. Павар А. П., Чипенс Г. И. (1970) Ж. общ. химии, **41**, 467—476.
7. Rossum van J. M. (1963) Arch. int. Pharmacodyn., **143**, 299—330.
8. Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M. (1974) in: Angiotensin. Handbook of experimental pharmacology. New series. XXXVII. (Page I. H., Bumpus F., eds), pp. 126—161, Berlin — New York.
9. Чипенс Г. И., Афанасьева Г. А., Анцанс Ю. Е., Залитис Г. М., Вегнер Р. Э., Балодис Ю. Ю. (1978) Биохимия, 872—879.
10. Балодис Ю. Ю., Никифорович Г. В. (1980) Биоорган. химия, **6**, 865—875.
11. Streeten D. H. P., Anderson G. H., Dalakos T. G. (1976) Amer. J. Med., **60**, 817—824.
12. Pettinger W. A., Mitchell M. C. (1976) Fed. Proc., **35**, 2521—2525.
13. Laragh J. H., Case D. B., Wallace J. M., Keim H. J. (1977) Fed. Proc., **36**, 1781—1787.
14. Case D. B., Wallace J. M., Keim H. J., Sealey J. E., Laragh J. H. (1976) Amer. J. Med., **60**, 825—836.
15. Wallace J. M., Case D. B., Laragh J. H., Keim H. J., Drayer J. I. M., Sealey J. E. (1979) Circ. Res., **44**, 38—44.
16. Waks U. A., Maxwell M. H., Marks L., Lawada E. T., Kaufman J. J. (1978) Circulation, **27**, 1165—1170.
17. Keim N. J., Drayer J. I., Case D. B., Lopez-Ovejero J., Wallace J. M., Weber M. A., Laragh J. M. (1976) N. Engl. J. Med., **295**, 1175—1177.
18. Hsieh K. H., Jorgensen E. C., Loe T. C. (1979) J. Med. Chem., **22**, 1038—1044.
19. Балодис Ю. Ю., Вегнер Р. Э., Никифорович Г. В., Чипенс Г. И. (1978) Биоорган. химия, **4**, 481—488.

Поступила в редакцию
3.VI.1980

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF [Asn¹, aza-Hva³]- and [Asn¹, aza-Hva³, Ile⁸] ANGIOTENSIN

ANCANS J., MAKAROVA N. A., CHIPENS G.

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

Two novel analogs of angiotensin containing an aza- α '-homo-*L*-valine residue in position 3 have been synthesized using conventional methods of peptide chemistry and assayed as to their pressor and myotropic activity. [Asn¹, aza-Hva³]angiotensin, a partial agonist of the natural hormone, exerts strong antagonistic action (pA_2 9,2±0,4) when tested on the rat colon ascendens. Still stronger antagonism to angiotensin is exhibited by [Asn¹, aza-Hva³, Ile⁸]angiotensin (pA_2 9,7±0,2) which is virtually devoid of any intrinsic activity of the natural hormone.