



УДК 547.964.4:577.17.07

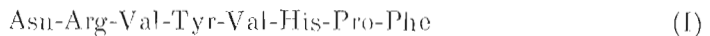
## ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ (1-АСПАРАГИН, 5-ВАЛИН, 8-АЛАНИН)- И (1-ГИДАНТОИНОВАЯ КИСЛОТА, 5-ВАЛИН, 8-АЛАНИН)-АНГИОТЕНЗИНА II\*

*Романовска И. К., Шавар А. П., Чупене Г. И.*

*Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

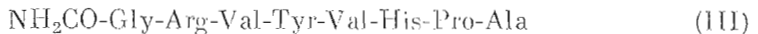
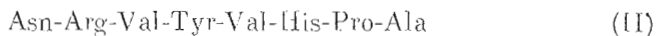
На полимерном носителе синтезированы 2 аналога тканевого гормона ангиотензина II: (1-аспарагин, 5-валин, 8-аланин)- и (1-гидантоиновая кислота, 5-валин, 8-аланин)-ангиотензин II. Показано, что полученные октапептиды являются специфическими антагонистами природного гормона в условиях *in vivo* и *in vitro*. Предложен новый вариант применения 2,4-динитрофенильной группы для защиты имидазольного кольца гистидина в условиях твердофазного синтеза.

N-Концевой трипептид и некоторые другие фрагменты (Asn<sup>1</sup>. Val<sup>5</sup>)-ангиотензина II



обладают выраженной миотропной активностью в опытах *in vitro* на различных препаратах гладкой мускулатуры [2, 3]. С целью изучения механизма и направленности их действия на клеточном и молекулярном уровнях определенным интерес вызывает применение для блокировки рецепторов специфических антагонистов ангиотензина II. Известно, что таковыми являются аналоги природного гормона, модифицированные в положении 8 [4, 5].

В настоящем сообщении описан синтез двух антагонистов ангиотензина II — (Asn<sup>1</sup>, Val<sup>5</sup>, Ala<sup>8</sup>)-ангиотензина II (II) и (NH<sub>2</sub>CO-Gly<sup>1</sup>, Val<sup>5</sup>, Ala<sup>8</sup>)-ангиотензина II (III) [6]:



Октапептиды (II) и (III) получены методом твердофазного синтеза на сополимере стирол-дивинилбензол (2%) с использованием 2,5 ÷ 3,3-кратного избытка N<sup>α</sup>-*tert*-бутилгоксикарбонилпроизводных аминокислот (в том числе N<sup>α</sup>-нитроаргинина, O-бензилтирозина, N<sup>im</sup>-2,4-динитрофенилгистидина) и ДЦГК в качестве конденсирующего агента.

После присоединения к хлорметилированному полимеру C-концевой аминокислоты Вос-аланина (емкость аминоацил-полимера 0,81 ммоль/г)

\* Используются сокращения, рекомендованные IUPAC [1], кроме того; ДЦГК — N,N'-дициклогексилакарбодимид, ДМФА — диметилформамид.

## Программа синтеза пептидов на полимерном носителе

Номер операции	Операция	Объем реагента на 6 г полимера, мл	Время, мин.	Число операций
1	Промывка $\text{CH}_3\text{COOH}$	50	5	3
2	Обработка 1 н. раствором $\text{HCl}$ в $\text{CH}_3\text{COOH}$	50	45	1
3	Промывка $\text{CH}_3\text{COOH}$	50	5	3
4	Промывка безводным этанолом	50	5	3
5	Промывка $\text{CHCl}_3$	50	5	3
6	Обработка 10%-ным раствором триэтиламина в $\text{CHCl}_3$	50	15	1
7	Промывка $\text{CHCl}_3$	50	5	3
8	Промывка $\text{CH}_2\text{Cl}_2^*$	50	5	3
9	Прибавление раствора 12 ммоль Во <sup>+</sup> аминокислоты в $\text{CH}_2\text{Cl}_2^*$	30	10	1
10	Прибавление раствора 12 ммоль ДЦГК в $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	20	120	1
11	Промывка $\text{CH}_2\text{Cl}_2^*$	50	5	3

\* В случае присоединения  $\text{N}^\alpha$ -Вос,  $\text{N}^{\text{H}}$  — Дир-гидрида и  $\text{N}^\alpha$ -Вос,  $\text{N}^{\text{G}}$ -нитроаргинаина вместо  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  применяли ДМФА.

Таблица 2

## Емкость пептидполимера после удаления Вос-группировок и депротонирования триэтиламина

Номер стадии	Присоединенный аминокислотный остаток	Количество $\text{Cl}^-$ , ммоль	Емкость пептид-полимера, ммоль	Выход на стадии, % от теоретического
1	Ala	4,9	4,9	
2	Pro	4,4	4,4	90
3	His(Dnp)	7,7*	3,85	88
4	Val	7,6	3,8	99
5	Tyr(Bzl)	7,5	3,75	99
6	Val	7,2	3,6	96
7	Arg( $\text{NO}_2$ )	7,2	3,6	100

\* Удваивание количества связанных  $\text{Cl}^-$  вызвано протонированием имидазольного кольца гистидина.

реакции наращивания пептидной цепи и отщепления защитных групп (табл. 1) проведены в стеклянном реакционном сосуде [7] с 6 г Вос-аланил-полимера.

Как показало определение количества непрореагировавших аминогрупп по Дорману [8], ацилирование Вос-пролином аланил-полимера было осуществлено лишь на 90%. Поэтому с целью предотвращения появления ошибочных (неполных) последовательностей непрореагировавшие аминогруппы аланил-полимера были блокированы ангидридом янтарной кислоты.

Емкость пептид-полимера после проведения 6- и 7-й операций определяли косвенным методом [9] — по количеству  $\text{Cl}^-$  в объединенных фильтрах (табл. 2).

Снижение емкости пептид-полимера в стадии 3 объясняется, по-видимому, внутримолекулярным амфолизом сложноэфирной связи между пептидом и полимерным носителем после нейтрализации хлоргидрата пролил-аланил-полимера. Подобное явление при твердофазном синтезе пептидов наблюдалось неоднократно, особенно в случаях пролин- и глицинсодержащих дипептидов [10, 11].

После синтеза Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr(Bzl)-Val-His(Dnp)-Pro-Ala-полимера — (IV)-полимер — и отщепления N<sup>α</sup>-Boc-группы полученный продукт был разделен на две части: одну часть подвергали ацилированию *n*-нитрофениловым эфиром Boc-аспарагина для получения защищенного (II)-полимера; вторую — гидроксиновой кислотой, посредством ДЦГК, с целью синтеза защищенного (III)-полимера.

Подбор оптимальных условий для удаления N<sup>im</sup>-Dnp-группы [12] был проведен на модельном соединении Boc-His(Dnp)-Pro-Phe-полимер, синтезированном по стандартной программе (табл. 1). Показано, что N<sup>im</sup>-Dnp-группу лучше всего отщеплять 2-меркаптоэтанолом до снятия пептида с полимерного носителя. Такое решение позволяет селективно деблокировать имидазольное кольцо гистидинового остатка и легко избавиться от серосодержащих побочных продуктов, которые могут в значительной степени осложнять удаление других защитных группировок путем каталитического гидрогенолиза. Обработкой частично защищенного трипептидил-полимера HBr в CF<sub>3</sub>COOH получен дибромгидрат His-Pro-Phe(V) [13].

На основании результатов, полученных с модельным соединением, N<sup>im</sup>- и Dnp-группы с защищенных (II)- и (III)-полимеров отщепила 25-кратным избытком 2-меркаптоэтанолом. Дальнейшая обработка этих соединений HBr в CF<sub>3</sub>COOH и гидрирование в присутствии палладиевой черни привело к свободным октапептидам (II) и (III).

Синтезированные соединения (II) и (III) очищены препаративным электрофорезом в тонком слое полиакриламидного геля акрилекс П-2 в растворе 1 н. CH<sub>3</sub>COOH.

Результаты предварительных биологических исследований, проведенных Н. В. Мышляковой и З. П. Луной под руководством В. К. Клуши (Институт органического синтеза АН ЛатвССР), показали, что пептиды (II) и (III) являются специфическими антагонистами аналога ангиотензина II (I) как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro*. Конкурентный антагонизм аналогов (II) и (III) к ангиотензину (но не к брадикинину и ацетилхолину) на изолированном *colon ascendens* крысы [14] проявляется уже в концентрациях 10<sup>-10</sup> — 10<sup>-9</sup> М и характеризуется константами pA<sub>2</sub> 9,85 ± 0,29 и 9,82 ± 0,23 соответственно. В опытах *in vivo* на наркотизированных уретаном крысах с полной блокадой вегетативных ганглиев бензогексоном оба соединения снижают прессорный эффект пептида (I), при этом соединение (III) является более сильным антагонистом, чем (II). Подробнее о биологических свойствах синтезированных октапептидов (II) и (III) и их агонистическом и антагонистическом действии относительно аналога (I) и его фрагментов будет сообщено отдельно.

### Экспериментальная часть

В работе использовали хлорметилированный сополимер стирол-дивинилбензол (2%) с содержанием активного хлора 2,75 ммоль на 1 г полимера и хроматографически однородные N<sup>α</sup>-Boc-аминокислоты фирмы «Reanal» (Венгрия). Упаривание растворов проводили на ротационном вакуумном испарителе при остаточном давлении 12—15 мм рт. ст.

Удельное оптическое вращение  $[\alpha]_D^{20}$  определяли на поляриметре модели 141 фирмы «Perkin-Elmer» (США). Для нисходящей хроматографии на бумаге FN-3 («Filltrak», ГДР) использовали системы: 1-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5 (А); 1-бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин, 30 : 6 : 24 : 20 (Б). Электрофоретическую подвижность пептидов относительно подвижности гистидина E<sub>HIS</sub> определяли на бумаге FN-16 в 1 н. CH<sub>3</sub>COOH (рН 2,4; градиент напряжения 15 В/см) и в пиридин-ацетатном буфере (рН 5,0; 9 В/см). Хромато- и электрофореграммы проявляли индигрином и реагентами Паули и Эрлиха [15]. Свободные синтезированные пептиды очищали методом электрофореза в 1 н. уксусной кислоте; в качестве носителя использовали слой полиакриламидного геля

акрилекс П-2 толщиной 0,5 см, длиной 18,5 см; ширину слоя выбирали согласно расчету — 1 см на 4 мг вещества; подаваемое на слой напряжение — примерно 800 В. Аминокислотный состав гидролизатов конечных продуктов (6 н. HCl, 105°, 20 ч) определяли качественно на тонкослойных пластинках Фиксион 50 × 8 фирмы «Chimoin» в Na-цитратном буфере при pH 3,3 и 50° [16]; результаты анализа подтвердили чистоту и идентичность синтезированных соединений.

*Вос-аланил-полимер.* В растворе 2,84 г Вос-аланина и 2,09 мл триэтиламина в 50 мл безводного этанола суспендировали 5,0 г хлорметилированного полимера и кипятили 48 ч. Полимер отфильтровывали, промывали этанолом, водой, этанолом и сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Выход 6,14 г.

*Вос-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr(Bzl)-Val-His(Dnp)-Pro-Ala-полимер ((IV) - полимер).* 6,0 г Вос-аланил-полимера погружали в реакционный сосуд емкостью 75 мл и удаляли Вос-группу 1 н. раствором хлористого водорода в CH<sub>3</sub>COOH (см. табл. 1). Определение количества ионов хлора потенциометрическим титрованием 0,1 н. раствором нитрата серебра в фильтратах после обработки хлоргидрата аланил-полимера триэтиламином и промывки хлороформом показало, что емкость аланил-полимера равна 0,81 ммоль/г. После ацилирования аланил-полимера Вос-пролином непрореагировавшие аминокислотные группы (0,55 ммоль — определено по методике Дормана [8]) ацилировали 0,40 г ангидрида янтарной кислоты в растворе 30 мл хлороформа. Присоединение N<sup>α</sup>-Вос.Ni<sup>im</sup>-Dnp-гистидина, Вос-валина, N<sup>α</sup>-Вос-O-Bzl-тирозина, Вос-валина и N<sup>α</sup>-Вос.N<sup>G</sup>-нитроаргинина проводили согласно общей методике (табл. 1). Выход защищенного гептапептидильного полимера 9,91 г.

*Вос-фенилаланил-полимер.* 1,0 г хлорметилированного полимера суспендировали в 7,0 мл ДМФА и выдерживали при 70° 4 ч. К набухшему полимеру приливали раствор 1,68 г дициклогексиламмониевой соли Вос-фенилаланина в 5,0 мл ДМФА и нагревали 20 ч при 70°. Полимер отсасывали и промывали на фильтре уксусной кислотой, этанолом, 50%-ным этанолом, водой и этанолом, сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Выход 1,36 г.

*Дибромгидрат His-Pro-Phe (V).* 1,36 г Вос-фенилаланил-полимера помещали в реакционный сосуд емкостью 25 мл и удаляли Вос-группу по общей методике. Фильтраты после нейтрализации триэтиламином и промывки хлороформом упаривали, сухой остаток растворяли в воде и потенциометрически титровали 0,1 н. раствором нитрата серебра. Содержание ионов хлора в фильтрате равнялось 1,45 ммоль, что соответствовало содержанию 1,07 ммоль аминокислоты на 1 г сухого полимера. В последующих стадиях синтеза фенилаланил-полимер ацилировали 0,81 г Вос-пролина и 1,61 г N<sup>α</sup>-Вос, N<sup>im</sup>-Dnp-гистидина. N<sup>im</sup>-Dnp-группировку удаляли обработкой пептидильного полимера раствором 3,0 мл 2-меркаптоэтанола в 10 мл ДМФА в течение 20 ч, полимер промывали ДМФА и этанолом и сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Для снятия пептида с полимера с одновременным удалением защитной группы полученный Вос-His-Pro-Phe-полимер суспендировали в 15 мл трифторуксусной кислоты и через суспензию в течение 15 мин пропускали ток сухого бромистого водорода. Полимер отсасывали и промывали трифторуксусной кислотой (3 × 15 мл). Объединенные фильтраты упаривали досуха; продукт растирали с эфиром, отсасывали, промывали эфиром и сушили в вакууме над КОН и активированным углем. Выход дибромгидрата (V) 0,57 г (70%, считая на фенилаланин); т. пл. 130—140° (разл.); R<sub>f</sub> 0,38 (А); R<sub>f</sub> 0,40 (Б); E<sub>His</sub> 0,94 (pH 2,4), 0,78 (pH 5,0). (По данным работы [13], т. пл. 130—145° (разл.).)

*Дибромгидрат Asn-Arg(NO<sub>2</sub>)-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala(VI).* N-Концевую защиту с 7,10 г (IV)-полимера отщепляли согласно обычной методике (см. табл. 1) и ацилировали пептидильный полимер раствором 2,75 г *n*-нитрофенилового эфира карбобензоксипарафина в 30 мл ДМФА в течение 24 ч. Продукт промывали ДМФА и удаляли N<sup>im</sup>-DNP-защитную группу обработкой 10 мл 2-меркаптоэтанола в 10 мл ДМФА в течение

20 ч. Пептидил-полимер промывали трижды ДМФА, этанолом и трифторуксусной кислотой и суспендировали в 50 мл трифторуксусной кислоты. Снятие пептида с полимера с одновременным удалением защитных групп и последующую обработку проводили, как описано выше для получения дибромгидрата (V). Выход дибромгидрата (VI) 2,80 г (61%, считая на аланин);  $E_{\text{His}}$  0,63 (рН 2,4). Полученное вещество растворяли в 15 мл дистиллированной воды, промывали 1-бутанолом ( $2 \times 20$  мл), водный слой упаривали досуха и переосаждали из минимального количества этанола эфиром. Выход электрофоретически однородного продукта с  $E_{\text{His}}$  0,63 (рН 2,4) 2,0 г (45%).

*Asn<sup>1</sup>, Val<sup>5</sup>, Ala<sup>8</sup>-ангиотензин II (II)*. 2,00 г дибромгидрата (VI) в растворе 50 мл смеси метанола — уксусной кислоты — воды (6:1:1) гидрировали над окисью палладия в течение 48 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха и остаток переосаждали из этанола эфиром. Выход аналога (II) 1,34 г (32%, считая на аланин);  $E_{\text{His}}$  0,86 (рН 2,4).

0,065 г полученного продукта очищали путем препаративного электрофореза в слое полиакриламидного геля акрилекс П-2. Выход аналога (II) 0,047 г; т. пл. 220—225° (разл.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  — 60° ( $c$  0,3; 1 н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ );  $R_f$  0,15 (A);  $R_f$  0,21 (B);  $E_{\text{His}}$  0,86 (рН 2,4);  $E_{\text{His}}$  0,78 (рН 5,0). Данные работы [4]:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  — 59,4° ( $c$  1; 1н.  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Найдено, %: С 48,83; Н 7,17; N 16,56.  $\text{C}_{46}\text{H}_{66}\text{N}_{14}\text{O}_{11} \cdot 3\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 49,05; Н 7,14; N 16,46.

*Бромгидрат  $\text{NH}_2\text{CO-Gly-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Val-Tyr-Val-His-Pro-Ala}$  (VII)*. После отщепления N-концевой защиты с 2,84 г (IV)-полимера по обычной методике (см. табл. 1) свободный пептидил-полимер ацилировали 0,30 г гидантионовой кислоты с помощью 0,52 г ДЦГК в растворе 15 мл ДМФА и отщепляли  $\text{N}^{\text{im}}$ -Dnp-группу обработкой 5,0 мл 2-меркаптоэтанола в 5 мл ДМФА в течение 20 ч. Пептидил-полимер промывали трижды ДМФА и этанолом, сушили в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$  и суспендировали в 20 мл трифторуксусной кислоты. Снятие пептида с полимера с одновременным удалением защитных групп проводили, как описано выше. Выход бромгидрата (VII) 0,86 г (55%, считая на аланин);  $E_{\text{His}}$  0,53 (рН 2,4). Полученное вещество растворяли в 10 мл дистиллированной воды, промывали дважды по 10 мл 1-бутанолом ( $2 \times 10$  мл), водный слой упаривали досуха и переосаждали из этанола эфиром. Выход электрофоретически однородного продукта с  $E_{\text{His}}$  0,53 (рН 2,4) 0,58 г (37%).

*$\text{NH}_2\text{CO-Gly}^1, \text{Val}^5, \text{Ala}^8$ -ангиотензин II (III)*. 0,58 г бромгидрата (VII) в растворе 15 мл смеси метанола — уксусной кислоты — воды (6:1:1) гидрировали над окисью палладия в течение 36 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали досуха и остаток переосаждали из этанола эфиром. Выход аналога (III) 0,44 г (32%, считая на аланин);  $E_{\text{His}}$  0,64 (рН 2,4).

0,040 г полученного продукта очищали путем препаративного электрофореза в слое полиакриламидного геля акрилекс П-2. Выход очищенного октапептида (III) 0,027 г; т. пл. 222—224° (разл.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  — 32° ( $c$  0,1;  $\text{CH}_3\text{COOH}$ );  $R_f$  0,21 (A);  $R_f$  0,30 (B);  $E_{\text{His}}$  0,64 (рН 2,4);  $E_{\text{His}}$  0,63 (рН 5,0). Найдено, %: С 47,64; Н 6,56; N 14,82.  $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_{14}\text{O}_{11} \cdot 5\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Вычислено, %: С 47,60; Н 7,07; N 14,90.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. IUPAC—IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Symbols for Amino — Acid Derivatives and Peptides. Recommendations — 1971. (1972) J. Biol. Chem., 247, 977—983.
2. Чипенс Г. И., Павар А. П., Клауша В. Е., Анцаев Ю. Е., Кибирев В. К. (1973) Химия природн. соедин., 77—83.
3. Chipens G. I., Auna Z. P., Klusha V. E., Krikis A. J., Pavar A. P., Papsuevich O. S., Romanovskis P. J., Vegner R. E. (1973) In Peptides 1972. Proc. 12-th European Peptide Symposium, Reinardsbrunn Castle, German DR, September 1972 (Hanson H., Jakubke H.-D. eds.), p. 437—449. Amsterdam — N. Holland Publ. Co., New York — Elsevier Publ. Co.

4. Khairallah P. A., Toth A., Bumpus F. M. (1970) *J. Med. Chem.*, **13**, 181—184.
5. Pals D. T., Massucci F. D., Denning G. S., Sipos F., Fessler D. C. (1971) *Circulation Res.*, **29**, 664—672.
6. Романовска И. К., Индулен Ю. И., Павар А. П., Клуша В. Е., Ауна З. П., Чипенс Г. П. (1974) 3-й Всесоюзный симпозиум по химии пептидов и белков, Тезисы докладов, стр. 128, Киев.
7. Стюарт Дж., Янг Дж. (1971) Твердофазный синтез пептидов, стр. 152—153, «Мир», М.
8. Dorman L. C. (1969) *Tetrahedron Lett.*, **28**, 2319—2321.
9. Okuda T., Zahn H. (1969) *Makromol. Chem.*, **121**, 87—101.
10. Билибия А. Ю., Кожевникова Н. Ю., Власов Г. П. (1973) *Ж. общ. химии*, **43**, 2046—2049.
11. Rothe M., Mazanek J. (1974) *J. Liebigs Ann. Chem.*, 439—459.
12. Shaltiel S., Fridkin M. (1970) *Biochemistry*, **9**, 5122—5127.
13. Mazur R. H., Schlatter J. M. (1963) *J. Org. Chem.*, **28**, 1025—1029.
14. Van Rossum J. M. (1963) *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **143**, 299—330.
15. Хроматография на бумаге (1962) (под ред. Хайса П. М. и Мацека К.) стр. 459, ИЛ, М.
16. Девевель Т., Золтан С. (1970) 7-й международный симпозиум по химии природных соединений, Рига, 21—27 ноября 1970 г., Тезисы докладов, стр. 55, «Зинатне», Рига.

Поступила в редакцию  
13.I.1975

**SOLID PHASE SYNTHESIS OF (1-ASPARAGINE, 5-VALINE,  
8-ALANINE)- AND (1-HYDANTOIC ACID, 5-VALINE,  
8-ALANINE)-ANGIOTENSIN II**

ROMANOVSKA I. K., PAVAR A. P., CHIPENS G. I.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences  
of Lat.SSR, Riga*

Two analogs of the tissue hormone angiotensin II have been synthesized on a polymeric carrier, namely (1-asparagin, 5-valine, 8-alanine)- and (1-hydantoic acid, 5-valine, 8-alanine)-angiotensin II. The octapeptides obtained were shown to be specific antagonists of the native hormone both in vivo and in vitro. A modified procedure utilizing N<sup>1m</sup>-2,4-dinitrophenyl group was proposed for the protection of histidine imidazole ring under the conditions of solid phase synthesis.