



УДК 547.964.4' 831.9.057 : 577.152.343.042

© 1991 г.

*М. П. Филатова, Н. А. Крит, Н. Н. Ускова,  
Е. М. Максимова, Н. Н. Грачева, З. Рейссманн\**

### СИНТЕЗ ИНГИБИТОРОВ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТКИ ЗАМЕЩЕННЫХ ХИНОЛИНОВ, И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

*Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва;  
\* Университет им. Ф. Шиллера, ГДР*

Осуществлен синтез ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента — аналогов трипептида  $Vz-Phe-Ala-Pro$  с заменой N- и C-концевых аминокислотных остатков на остатки 8-метоксв-5-сульфохинолина и 1,2,3,4-тетрагидрохинолинкарбоновых кислот соответственно. Определена биологическая активность синтезированных соединений *in vivo* и *in vitro*. Показано отсутствие выраженной специфичности  $S_2'$ -участка фермента к положению карбоксильной группы гетероцикла в C-концевом участке молекулы ингибитора. Установлено, что введение в N-концевой участок ингибиторов АПФ радикалов модифицированных хинолинов не увеличивает специфическое взаимодействие с гидрофобным карманом фермента.

Известно, что АПФ — ключевой фермент двух протеолитических систем организма: ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой. Он локализуется во всех сосудах вплоть до капилляров, где имеются наиболее благоприятные условия для контакта с веществами, циркулирующими в крови. АПФ регулирует концентрацию вазоактивных пептидов — ангиотензина II и брадикинина, обладающих противоположным действием на сосудистый тонус: он освобождает из неактивного предшественника ангиотензин II, который повышает кровяное давление, и инактивирует брадикинин, являющийся мощным гипотензивным агентом. Вследствие этого ингибирование действия АПФ приводит к понижению повышенного кровяного давления. Таким образом, целенаправленный поиск ингибиторов АПФ является примером конструирования антигипертензивных соединений, основанного на использовании закономерностей биохимических процессов в организме.

В связи с этим представляется практически важной задача получения дополнительной информации о структурных требованиях фермента к веществам, включенным в фермент-субстратный комплекс.

В литературе предложена гипотетическая модель активного центра АПФ (рис. 1) [1], которая базируется на ряде общих структурных элементов, характерных для высокоактивных ингибиторов АПФ: 1) наличие на C-конце остатка пролина со свободным карбоксилем, который связывается с остатком аргинина в активном центре фермента; 2) наличие на N-конце гидрофобного остатка, который связывается с гидрофобным карманом фермента; 3) наличие на N-концевом участке группировки, способной связываться с ионом цинка активного центра фермента.

Однако эта модель дает лишь некоторые общие представления о структурных особенностях ингибиторов, и при синтезе новых соединений по-прежнему часто используется эмпирический подход.

Сокращения: АПФ — ангиотензинпревращающий фермент, DPPA — дифенилфосфорилазид, TEA — триэтиламин, Thq-OH — 1,2,3,4-тетрагидрохинолинкарбоновая кислота.

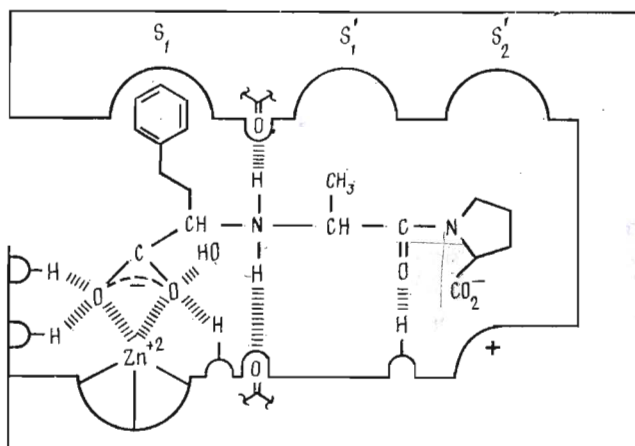
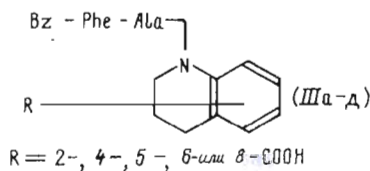
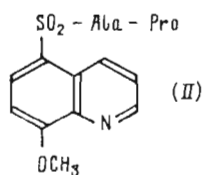


Рис. 1. Гипотетическая модель взаимодействия эналаприлата — высокоактивного ингибитора АПФ, используемого в медицинской практике, — с активным центром АПФ [1]

Ранее [2] нами в поисках новых структур ингибиторов АПФ был исследован ряд модифицированных ацилпроизводных трипептидов, среди которых были найдены соединения, обладающие высокой активностью по снижению кровяного давления у крыс *in vivo*. Ключевой идеей нашего нового подхода стало включение в молекулу неприродных аналогов аминокислот с целью повышения устойчивости потенциальных ингибиторов к протеолитической деградации.

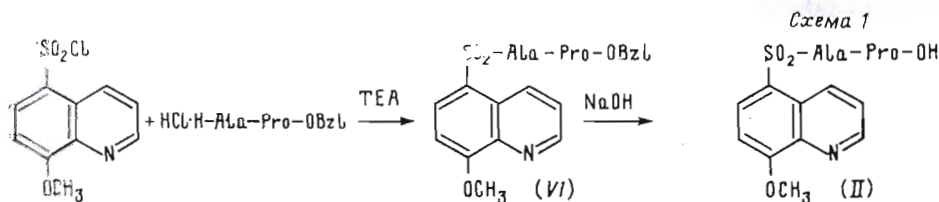
В поисках таких модификаций мы основывались на данных о том, что различные замещенные хинолины, а также гибридные структуры, включающие в себя хинолиновую и аминокислотную или пептидную компоненты, проявляют высокую ингибирующую активность к АПФ [3].

В качестве модельного соединения был выбран *N*-бензоилфенилаланил-аланил-пролин (I), обладающий самой высокой ингибирующей активностью среди известных ацилтрипептидов, содержащих природные аминокислотные остатки [2]. Нами были синтезированы ингибиторы трипептидного типа, содержащие остаток хинолина или его тетрагидропроизводного в *N*- и *C*-концевой части молекулы, — соединения (II) и (III) соответственно. При синтезе соединения (II) предполагалось изучение влияния остатков хинолина в *N*-концевом участке молекулы на эффективность взаимодействия с гидрофобным карманом фермента.

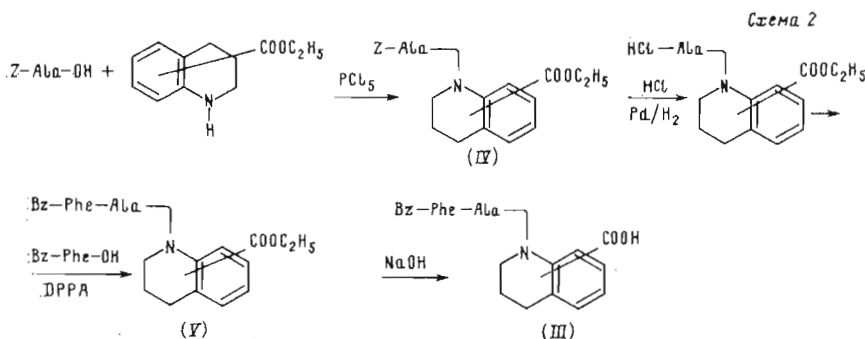


Признано, что высокое сродство остатков иминокислот в молекуле ингибиторов к *S*<sub>2</sub>'-участку фермента объясняется жесткостью конформации гетероциклического остатка и, следовательно, фиксированным положением карбоксильной группы, которая у подавляющего большинства ингибиторов находится в соседнем положении по отношению к азоту гетероцикла. Однако в литературе отсутствуют систематические данные, подтверждающие это предположение. Поэтому при синтезе серии аналогов (III) предполагалось получение данных о специфичности *S*<sub>2</sub>'-участка фермента к положению *C*-концевой карбоксильной группы.

Ингибитор (II) получали взаимодействием 8-метокси-5-хинолинсульфохлорида с Ala-Pro-OBzl и последующим омылением бензильного эфира (схема 1).



Ингибиторы, содержащие остаток тетрагидрохинолина с этоксикарбонильной группой в различных положениях кольца, были синтезированы по схеме 2. Для конденсации бензилоксикарбонилаланина с этоксикарбонилтетрагидрохинолинами оптимальным оказался хлорангидридный метод, что связано, по-видимому, с низкой нуклеофильностью гетероциклического азота производного хинолина.



При использовании азидного метода с DPPA или карбодимидного метода продукт реакции был выделен в следовых количествах, а при применении DCC в присутствии 1-гидроксибензотриазола был выделен лишь 1-оксибензотриазоловый эфир бензилоксикарбонилаланина. В связи с этим для конденсации был опробован хлорангидридный метод, дающий наибольшую степень активации карбоксильной группы. В ходе его использования было показано, что хлорангидрид бензилоксикарбонилаланина чрезвычайно неустойчив и разлагается даже при осторожном упаривании его эфирного раствора с образованием симметричного ангидрида, который реагирует с замещенными хинолинами с крайне низким выходом. В том случае, если хлорангидрид вводили в реакцию в растворе, его разложение было минимальным и конденсация проходила с выходом от 70 до 85% в зависимости от положения этоксикарбонильной группы.

Известно, что использование хлорангидридного метода конденсации связано с риском рацемизации, однако легкость ее протекания в значительной степени зависит от природы N-защитных групп. Так, для бензилоксикарбонилаланина [4] было показано полное сохранение оптической активности при применении хлорангидридного метода в условиях проведения нами синтеза соединений (IVa)—(IVд) (см. табл. 1), что позволило нам использовать этот метод при синтезе оптически активных пептидов (IIIa)—(IIIд).

Отщепление бензилоксикарбонильной группы осуществлялось гидрированием над палладиевой чернью в присутствии 1 моль HCl с образованием хлоргидрата дипептида. При гидрировании без кислоты происходило превращение дипептида в продукт, не дающий нингидриновой реакции, причем хроматографическая подвижность полученных соединений различалась в зависимости от положения этоксикарбонильной группы в гетероцикле. Механизм превращения основания дипептида и идентификации продуктов превращения будет описан в отдельной публикации.

Известно, что введение бензоиламинокислот в пептидную цепь карбодимидным методом и методом активированных эфиров сопровождается заметной рацемизацией, в то время как применение азидного метода поз-



## Характеристики синтезированных соединений

Соединение	Формула	Положение COOH-группы в Thq	$R_f$ *	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$ (с 1, DMF), град	Выход, %	
IVa	Z-Ala-Thq-OEt	2	0,46(A) 0,70(Б)	89—81	+64,4	89	
IVб		4	0,86(В) 0,87(Г)		+99,2	57	
IVв		5			+65,5	59	
IVг		6			+93,0	84	
IVд	Bz-Phe-Ala-Thq-OEt	8			-42,6	78	
Va		2	0,39(A) 0,63(Б)	83—85	+66,8	75	
Vб		4	0,83(В) 0,60(Г)	150—151	+93,0	72	
Vв		5		96—98	+35,89 **	74	
Vг		6		179—180	+51,3	78	
Vд		8		154—156	-77,6	71,6	
IIIa		Bz-Phe-Ala-Thq-OH	2	0,38(A)	117—119	+13,1	64
IIIб			4	0,21(Г)	110—112	+61,8 **	63
IIIв		5		109—111	+28,0	63,8	
IIIг		6			+50,0	65	
IIIд		8		111—113	-67,6	64	

\*  $R_f$  не зависит от положения заместителя и приведено для групп соединений (III), (IV) и (V).

\*\* В MeOH (с 1).

воляет избежать потери оптической активности [5, 6]. Этот известный факт был дополнительно подтвержден нами синтезом трипептида (Vд) конденсацией Вос-фенилаланина с хлоргидратом аланил-8-этоксикарбонил-1,2,3,4-тетрагидрохиолина методом активированных эфиров с последующим бензоилированием продукта, полученного после отщепления Вос-группы. Угол вращения соединения (Vд), полученного бензоилированием трипептида, не отличался от такового, полученного с использованием DPPA и бензоилфенилаланина. В то же время применение для конденсации карбодиимидного метода или метода активированных эфиров приводило к заметному изменению угла вращения продукта по сравнению со стандартом. В связи с этим в используемой нами схеме для введения бензоилфенилаланина был выбран DPPA.

Омыление этоксикарбонильной группы синтезированных трипептидов, содержащих тетрагидрохиолины, замещенные в гетероциклическом ядре (положение 2 или 4), проводилось при комнатной температуре действием 2 н. NaOH в течение 30—40 мин. Омыление этоксикарбонильной группы в аналогичных дипептидах, замещенных в ароматическом ядре (положение 5, 6 или 8), в этих условиях в течение нескольких суток проходило на 10—15% и сопровождалось образованием побочного продукта Bz-Phe-Ala-OH. Для этих пептидов удалось достигнуть полноты омыления нагреванием реакционной смеси до 40—50° С в течение 40—50 мин.

Так как использование жестких условий омыления связано с возможностью рацемизации, а также деструкции пептидной связи, нами были подобраны условия ферментативного омыления эфирных групп с помощью эстеразы из печени свиньи. Оказалось, что в 1% растворе DMF в течение 20 ч возможно селективное омыление этоксикарбонильной группы без расщепления амидных связей. Полнота реакции контролировалась с помощью ВЭЖХ в системе ацетонитрил — 0,01 н. ацетат аммония, 6 : 4.

Для синтезированных соединений была определена активность по ингибированию АПФ, выделенного из легких свиньи (табл. 2). Из рассмотрения значений  $IC_{50}$  (табл. 2) следует, что введение тетрагидрохиолинового остатка вместо пиррольного в положение  $P_2$  вызывает некоторое увеличение активности по сравнению с модельным пептидом (I), причем в ряду синтезированных аналогов можно отметить даже несколько более высокую активность соединений, содержащих карбоксильную группу в ароматическом ядре, по сравнению с соединением, имеющим карбоксиль-

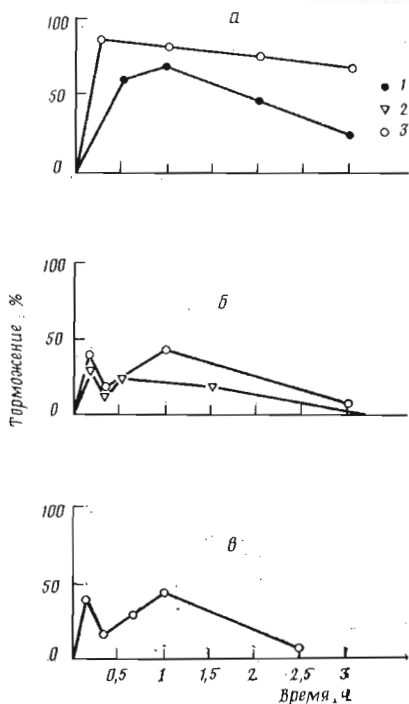


Рис. 2. Ингибирование прессорного ответа у крыс, вызванного введением ангиотензина I, каптоприлом (а) и модифицированными трипептидами (IIIа) (б) и (IIIб) (в), введенными per os в дозе 1 (1), 1,5 (2) и 3 мг/кг (3)

ную группу в положении 2 аналогично расположению в остатке пролина. Полученные результаты позволяют сделать вывод об отсутствии выраженной специфичности  $S_2$ -участка фермента к положению карбоксильной группы гетероцикла в С-концевом участке ингибиторов.

Введение хинолинового остатка, содержащего сульфогруппу, в положение  $P_1$  не приводит к изменению ингибирующей активности, которая сохраняется на уровне модельного трипептида (I). Аналогичный эффект наблюдался и при введении остатков хинолина вместо фенильного радикала в N-концевом участке ингибиторов N-карбоксиалкилдипептидного типа [7]. Таким образом, показано, что введение в N-концевой участок ингибиторов АПФ остатков хинолинов не увеличивает специфическое взаимодействие соединений с гидрофобным карманом АПФ.

Тестирование антигипертензивной активности модифицированных трипептидов с остатками хинолинкарбоновых кислот в С-концевой части молекулы по ингибированию прессорного ответа у крыс, вызванного введением ангиотензина I, показало, что в дозе 1,5 мг/кг при введении per os они вызывают 40—50% снижение кровяного давления (рис. 2). Из рисунка видно, что их воздействие уступает активности каптоприла — ингибито-

Таблица 2

АПФ-Ингибирующая активность модифицированных трипептидов

Номер соединения	Формула	Положение COOH-группы в Thq	IC <sub>50</sub> , мкмоль
I	Bz-Phe-Ala-Pro-OH	—	2,8 [2]
II	N-(Метоксихинолин-5-сульфонил)-Ala-Pro-OH	—	2,1
IIIа	Bz-Phe-Ala-Thq-OH	2	2,5
Vа	Bz-Phe-Ala-Thq-OEt	2	100
IIIб	Bz-Phe-Ala-Thq-OH	4	1,5
Vб	Bz-Phe-Ala-Thq-OEt	4	45
IIIв	Bz-Phe-Ala-Thq-OH	5	1,0
Vв	Bz-Phe-Ala-Thq-OEt	5	50
IIIг	Bz-Phe-Ala-Thq-OH	6	0,4
Vг	Bz-Phe-Ala-Thq-OEt	6	75
IIIд	Bz-Phe-Ala-Thq-OH	8	0,9
Vд	Bz-Phe-Ala-Thq-OEt	8	45

ра, широко используемого в настоящее время в медицинской практике [1]. Показательно, что в пределах ошибки опыта положение карбоксильной группы в гетероцикле практически не влияет на активность синтезированных аналогов in vitro.

### Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты и их производные фирмы Reanal. Индивидуальность полученных соединений проверяли ТСХ на пластинках Silufol (Kavalier, Чехо-Словакия) в системах хлороформ — метанол, 9 : 1 (А), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 17 : 2 : 1 (Б), хлороформ — этанол — вода, 30 : 12 : 1 (В), этилацетат — хлороформ, 3 : 2 (Г). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40—100 мкм (Chemapol, Чехо-Словакия). Температуры плавления (не исправлены) определяли на нагревательном столике Вöetius (ГДР). Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 241 (США), Аналитическую ВЭЖХ проводили на приборе «LCGAV» (Shimadzu, Япония) на колонке (3,3 × 150 мм) с силикагелем 3 мкм Separon SGX в системе этилацетат — гексан, 8 : 2. Растворы веществ в органических растворителях высушивали над MgSO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме при температуре не выше 40° С. Выходы и константы полученных соединений приведены в табл. 1. Найденные значения элементных анализов соответствовали вычисленным величинам.

*N*-(Бензилоксикарбонилаланил)-*X*-этоксикарбонил-1,2,3,4-тетрагидрохинолин (*X* = 2-, 4-, 5-, 6- или 8-) (IVa—d). К раствору 2,44 г (10,92 ммоль) Z-Ala-OH в 7 мл абс. эфира прибавляли 1,72 г (9,24 ммоль) измельченной PCl<sub>5</sub>, выдерживали при перемешивании 40 мин до полного растворения PCl<sub>5</sub>. Реакционный раствор концентрировали без нагревания до небольшого объема, добавляли 3 мл бензола и приливали к раствору 1,74 г (8,4 ммоль) *X*-этоксикарбонил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина в 2 мл бензола. К полученной смеси добавляли по каплям 2,4 мл (17,34 ммоль) ТЭА до рН 8 и оставляли при перемешивании на 20 ч при 20° С. Осадок отфильтровывали, к маточному раствору добавляли 15 мл этилацетата, промывали 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, водой, 8% NaHCO<sub>3</sub>, водой, сушили, упаривали. Полученное масло очищали колоночной хроматографией в системе хлороформ — гексан, 1 : 1.

*N*-(Бензоил-фенилаланил-аланил)-*X*-этоксикарбонил-1,2,3,4-тетрагидрохинолин (*X* = 2-, 4-, 5-, 6- или 8-) (Va)—(Vd). 0,5 г (1,22 ммоль) соединения (IVa)—(IVd) в 3 мл метанола гидрировали 5 ч над Pd-чернью в присутствии 0,7 мл (3,05 ммоль) 4,6 н. HCl в диоксане. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали, остаток затирали с абс. эфиром. Полноту прохождения реакции контролировали высоковольтным электрофорезом на бумаге FN 13 в градиенте потенциала 24 В·см<sup>-1</sup> в 1 М ацетатном буфере (рН 2,4).

Полученный хлоргидрат модифицированного дипептида растворяли в 5 мл DMF, прибавляли 0,36 г (1,34 ммоль) Vz-Phe-OH, охлаждали до -5° С и при перемешивании добавляли по каплям 0,31 мл (1,46 ммоль) DPPA и 0,41 мл (2,92 ммоль) ТЕА. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -5° С и 20 ч при 20° С, добавляли 200 мл этилацетата, этилацетатный раствор промывали водой, 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, водой, 8% NaHCO<sub>3</sub>, водой, сушили, упаривали. Остаток затирали с абс. эфиром.

*N*-(Бензоил-фенилаланил-аланил)-*X*-карбокси-1,2,3,4-тетрагидрохинолин (*X* = 2-, 4-, 5-, 6- или 8-) (IIIa)—(IIId). К раствору 50 мг (0,093 ммоль) этилового эфира (Va)—(Vd) в 0,5 мл метанола приливали 0,21 мл (0,48 ммоль) 2,3 н. NaOH, перемешивали 30 мин при 20° С (для а)—(б)) или 40 мин при 50° С (для в)—(д)). Метанол упаривали, добавляли 5 мл воды, подкисляли до рН 2, экстрагировали этилацетатом, сушили, упаривали.

Ферментативное омыление соединений (Va)—(Vd) проводили с помощью 1% раствора эстеразы из печени свиньи (Serva) в 1% растворе DMF, поддерживая рН 8 с помощью фосфатного буфера. Оптимальное время реакции для всех соединений, определенное с помощью ВЭЖХ в системе



ацетонитрил — 0,01 н. ацетат аммония (6 : 4) на колонке Nucleosil 100 C-18 (5 мкм), составило 20 ч.

*Бензиловый эфир N-(8-метоксихинолин-5-сульфонил)-аланил-пролина (VI)*. К раствору 0,38 г (1,2 ммоль)  $\text{HCl} \cdot \text{H-Ala-Pro-OBzl}$  в 4 мл DMF, охлажденному до 0° С, прибавляли при перемешивании сначала 0,34 мл ТЕА и затем раствор 0,33 г (1,2 ммоль) 8-метоксихинолин-5-сульфохлаорида в 3 мл сухого хлороформа, выдерживали 5 мин и добавляли еще 0,1 мл ТЕА до pH 9. Перемешивали 0,5 ч при 0° С и 20 ч при 20° С. Упаривали хлороформ, добавляли 40 мл этилацетата, промывали водой, 8%  $\text{NaHCO}_3$ , водой, 1%  $\text{HCl}$ , водой, сушили, упаривали и полученное масло (0,4 г) хроматографировали на колонке с силикагелем в условиях градиентной элюции (хлороформ — 25% метанол в хлороформе). Получали 0,3 г соединения (VI) в виде масла;  $R_f$  0,46 (хлороформ — ацетон, 4 : 1). Из кислых промывных вод после лиофилизации и хроматографической очистки получали еще 0,1 г соединения (VI); общий выход составил 66,6%.

*Хлоргидрат N-(8-метоксихинолин-5-сульфонил)-аланил-пролина (II)*. К раствору 0,2 г (0,39 ммоль) эфира (V) в 1,8 мл метанола приливали 0,4 мл 2 н.  $\text{HCl}$ , перемешивали 1,5 ч при 20° С, добавляли 4 мл воды, упаривали метанол, экстрагировали этилацетатом и водный раствор подкисляли 2 н.  $\text{HCl}$  до pH 3. Водный раствор лиофилизовали, маслянистому остатку приливали метанол, отфильтровывали от нерастворившегося осадка, упаривали и остаток переосаждали из метанола эфиром. Получали 0,11 г (67%) соединения (II) в виде сухой пены,  $[\alpha]_D^{20} +13,7^\circ$  (с 1, MeOH),  $R_f$  0,3 (n-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1).

*Ингибирование прессорного ответа у крыс, вызванного введением ангиотензина I, синтезированными соединениями при введении нормотензивным крысам (per os)*, было определено по методу [2].

*Ингибирование активности АПФ модифицированными трипептидами* было определено на препарате фермента, выделенного из почек свиньи, с использованием в качестве субстрата Bz-Gly-His-Leu по методу [8].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wyratt M. J., Patchett A. A. // Med. Res. Revs. 1985. V. 5. № 4. P. 483—531.
2. Reissmann S., Schwuchow C., Filatova M. P., Krit N. A., Siems W.-E., Heder G., Schrader U., Schubert H., Muller B., Bardl B., Paegelow I. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1988. V. 53. № 11 A. P. 2591—2598.
3. Ksander G. M., Juan A. M., Diefenbacher C. G., Stanton J. L. // J. Med. Chem. 1985. V. 28. № 11. P. 1606—1611.
4. Bergmann M., Zervas L. // Chem. Ber. 1932. B. 65. S. 1192—1205.
5. Williams M. W., Young G. T. // J. Chem. Soc. 1963. P. 881—889.
6. Shiori T., Yamoda Sh. // Chem. Pharm. Bull. 1974. V. 4. P. 849—854.
7. Крит Н. А., Грачева И. Н., Филатова М. П., Райссманн З. // Хим.-фармацевт. журн. 1991. № 5.
8. Siems W.-E., Heder G., Komissarova N. W. // Z. Med. Labor. Diagn. 1985. B. 26. S. 230.

Поступила в редакцию  
31.VII.1990

M. P. FILATOVA, N. A. KRIT, N. N. USKOVA, E. M. MAKSIMOVA,  
I. N. GRACHEVA, S. REISSMANN \*

#### SYNTHESIS AND STUDIES OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF INHIBITORS OF THE ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME, CONTAINING RESIDUES OF SUBSTITUTED QUINOLINE

*Institute of Biological and Medical Chemistry,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;  
\*F. Schiller University, Iena, GDR*

Inhibitors of the angiotensin-converting enzyme were synthesized by substituting N- and C-terminal amino acid residues of tripeptide Bz-Phe-Ala-Pro by the residues of 8-methoxy-5-sulphoquinoline and carboxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline, respectively, and their *in vivo* and *in vitro* biological activity was determined. The enzyme's  $S_2'$  site proved to be non specific to the position of the carboxylic group in the C-terminal heterocyclic part of the inhibitor molecule. Introducing a modified quinoline residue into the N-terminal part of the inhibitor does not increase its specific interaction with the hydrophobic pocket of the angiotensin-converting enzyme.