



УДК 547.964.4.057:577.152.341*51.042

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННО ОГРАНИЧЕННЫХ АНАЛОГОВ ПЕПТИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

*Филатова М. П., Крит Н. А., Комарова О. М.,
Орехович В. Н., Рейссманн З. *, Лиения Н. Т. **,
Никифорович Г. В. ***

*Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва;*

** Университет им. Ф. Шиллера, ГДР;*

*** Институт органического синтеза Академии наук Латвии, Рига*

В поисках подходов к созданию новых, высокоактивных ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента проведены синтез, исследование ингибирующей способности и конформационные расчеты аналогов брадикининпотенцирующих пептидов, в которых остатки Pro или Ala заменены на MeAla или D-Ala. Все синтезированные аналоги по ингибирующей способности резко уступают природным пептидам, что можно считать косвенным подтверждением правильности ранее высказанных предположений о реализации для указанных пептидов «конформации ингибирования».

В последние годы совместными усилиями химиков, биохимиков, фармакологов и медиков создан ряд эффективных антигипертензивных препаратов на основе ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (пептидилдипептидаза, КФ 3.4.15.1). Этот фермент является ключевым ферментом в регулировании кровяного давления в организме: он «освобождает» ангиотензин II, повышающий кровяное давление, из неактивного предшественника ангиотензина I и инактивирует брадикинин, являющийся мощным антигипертензивным агентом. Вследствие этого ингибирование действия АПФ приводит к нормализации патологически повышенного кровяного давления. Таким образом, целенаправленный поиск эффективных ингибиторов АПФ является примером «конструирования» лекарственных веществ, основанного на познании соответствующих биохимических процессов в организме.

Для успешного решения проблемы большое значение имеет создание адекватной модели комплекса АПФ с пептидным лигандом и, в частности, представления о конформации лиганда, субстрата или ингибитора в комплексе с АПФ. Гипотетическая модель активного центра АПФ, связывающего пептидный лиганд, была предложена Ондетти с соавт. [1, 2] по аналогии с активным центром карбоксипептидазы А, которая, как и АПФ, является Zn-содержащим ферментом. На основе этой модели авторы предложили весьма эффективный ингибитор АПФ — каптоприл, активный при пероральном применении. Однако в случае пептидных молекул эта модель не дает конкретных рекомендаций для выбора аминокислотных последовательностей, и «конструирование» пептидных ингибиторов в соответствии с ней затруднительно.

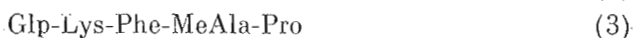
Другой подход к проблеме состоит в попытках определить «конформацию ингибирования», характерную для пептидного лиганда при связывании с АПФ, с помощью сопоставления расчетных наборов низкоэнергетических структур пептидных ингибиторов АПФ, обладающих

Сокращения: АПФ — ангиотензинпревращающий фермент, EEDQ — N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин, OTCr — 2,4,5-трихлорфенокси-, OPfr — пентафторфенокси-, DMF — диметилформамид, Glp — пироглутаминовая кислота, NOBT — 1-оксисбензотриазол, DCC — N,N'-дихлорогексилкарбодимид.

различными (низкими и высокими) значениями I_{50} . Предполагается, что искомая конформация должна присутствовать в наборах низкоэнергетических структур для всех ингибиторов с низким I_{50} и отсутствовать в таких же наборах для ингибиторов с высоким I_{50} [3]. Подобный прием был с успехом применен для поиска «биологически активных» конформаций ряда пептидных биорегуляторов [4]. Указанный подход был реализован в работах [3] и [5] (в работе [5] с незначительными отклонениями) на базе весьма эффективного брадикининпотенцирующего пентапептида $BPP_{5\alpha}$ (1), выделенного из яда *Bothrops jararaca*, и его аналогов.

Расчет пространственных структур соединения (1) и его пяти аналогов в работе [3] привел к выводу, что «конформацией ингибирования» пентапептида $BPP_{5\alpha}$ может быть структура пептидного остова типа $B/RBRB\hat{B}$ (в терминах локальных минимумов потенциальных карт аминокислотных остатков: $B - \varphi \sim -140^\circ, \psi \sim 140^\circ, R - \varphi \sim -60^\circ, \psi \sim -60^\circ; L - \varphi \sim 60^\circ, \psi \sim 60^\circ; H$ (для D -аминокислот и глицина) $- \varphi \sim 140^\circ, \psi \sim -80^\circ$, « \wedge » означает *цис*-конформацию остатка Pro, отсчет углов внутреннего вращения согласно работе [6]) или типа $B/RBRBL$ для тех активных аналогов $BPP_{5\alpha}$, где невозможна *цис-транс*-изомеризация пептидной связи между остатками 4–5 (например, $[Phe^3, Ala^5]BPP_{5\alpha}$). В то же время в работе [5] на основании расчетов четырех аналогов соединения (1) в качестве конформации, «ответственной» за ингибирование, была предложена конформация типа $RRRBR$. *цис*-Конформация остатка Pro в расчетных работах, послуживших основой для выводов в работе [5], не рассматривалась. Предлагаемые расчетом «конформации ингибирования» изображены на рис. 1.

Таким образом, в литературе описаны различные модели возможной конформации соединения (1) в составе комплекса с АПФ. Дополнительные сведения для обсуждения этого вопроса могут дать синтез и тестирование ингибирующей активности новых аналогов пентапептида (1) с модификациями, заведомо резко изменяющими локальные стерические условия пептидного остова, и исследование конформационной подвижности таких аналогов расчетными методами. В настоящей работе в качестве таких соединений были выбраны $[MeAla^4]BPP_{5\alpha}$ (2) и $[D-Ala^4]BPP_{5\alpha}$ (4):



Дополнительный практический интерес к выбранным объектам синтеза определялся следующим. Известно, что пентапептид (1) — один из самых активных ингибиторов АПФ [7], но его применение в медицинской практике затруднено ввиду того, что он одновременно служит субстратом этого фермента. Введение в положение 4 N -метиламинокислоты или D -аминокислоты придает пептиду устойчивость к расщеплению ферментами. Кроме того, известно, что целый ряд соединений пептидной и непептидной природы обладает более высокой активностью при наличии в положении 2 от C -конца остатка с D -конфигурацией асимметрического центра (например, D -Cys-Pro, каптоприл). Было высказано предположение [8] о необходимости сохранения этой особенности структуры для проявления высокой ингибирующей активности. Таким образом, соединения (2)–(4) были синтезированы в надежде получить высокоактивный ингибитор пептидилдипептидазы пролонгированного действия, причем соединение (3) предложено как упрощенный аналог пентапептида (2), более пригодный для практического применения.

Аналогичный подход был использован при синтезе соединений (7) и (8) — аналогов другого высокоактивного ингибитора АПФ, тепротид (5), и гибридного аналога (6), обладающего более высокой ингиби-

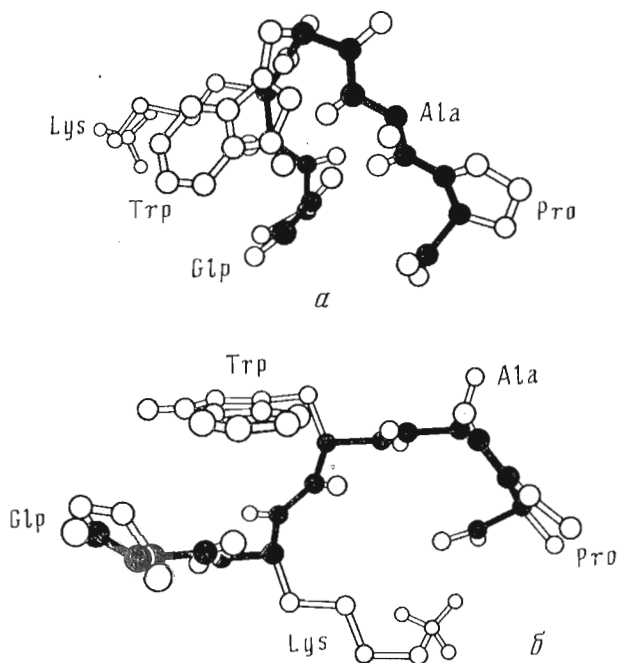
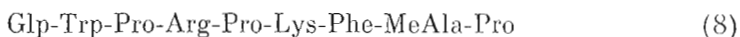
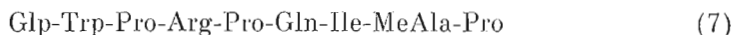
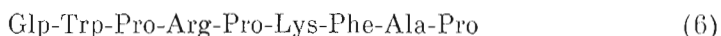


Рис. 1. Предполагаемые «конформации ингибирования» соединения (1) по данным работы [5] (а) и [3] (б). Здесь и далее на рисунках выделены атомы пептидного остова

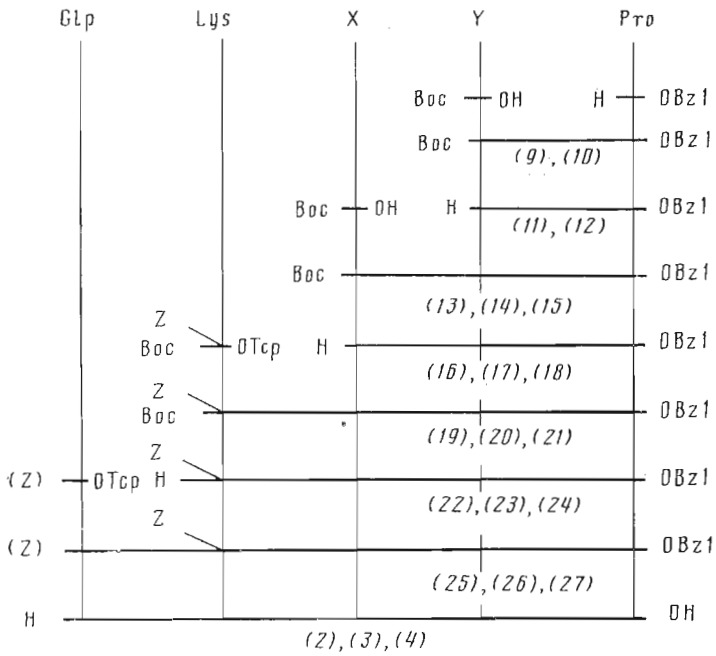
рующей активностью, чем тепротид [7], но являющегося одновременно субстратом АПФ:



Синтез пентапептидов (2)–(4) осуществляли последовательным наращиванием пептидной цепи с С-конца аналогично описанному нами ранее синтезу пентапептида (1) [9] (схема 1). Синтез нонапептидов (7) и (8) осуществляли фрагментной конденсацией 1+4+4 (схема 2). Характеристика всех синтезированных соединений приведена в табл. 1.

Поскольку известно, что образование N-метиламидной связи протекает намного труднее, чем амидной, а в выбранной нами схеме построения пептидной цепи защита С-концевой карбоксильной группы бензиловым эфиром увеличивала опасность образования дикетониперазина из С-концевого дипептида, мы опробовали несколько методов создания N-метиламидной связи. Так, было показано, что наиболее широко применяемый в этих случаях DCC-НОВТ-метод дает достаточно хорошие выходы трипептидов после хроматографической очистки продуктов реакции, причем на выход трипептидов строение карбоксильного компонента заметного влияния не оказывало. Использование метода смешанных ангидридов оказалось малоэффективным. Выход чистых трипептидов после хроматографической очистки не превышал 20–30%. Что касается метода активированных эфиров, то он, как правило, не находит широкого применения при образовании метиламидной связи из-за низких выходов [10]. Исследование реакции образования трипептидов (13), (14) и (28) показало, что применение *n*-нитрофениловых и 2,4,5-трихлорфениловых эфиров Woc-Phe или Woc-Trp в сочетании с НОВТ дает вполне удовлетворительные результаты (55–60%). Правда, в случае Woc-Ile-ONp выход трипептида (28) снижается до 25%. Высокоэффективным оказалось использование пентафторфениловых эфиров, с помощью которых

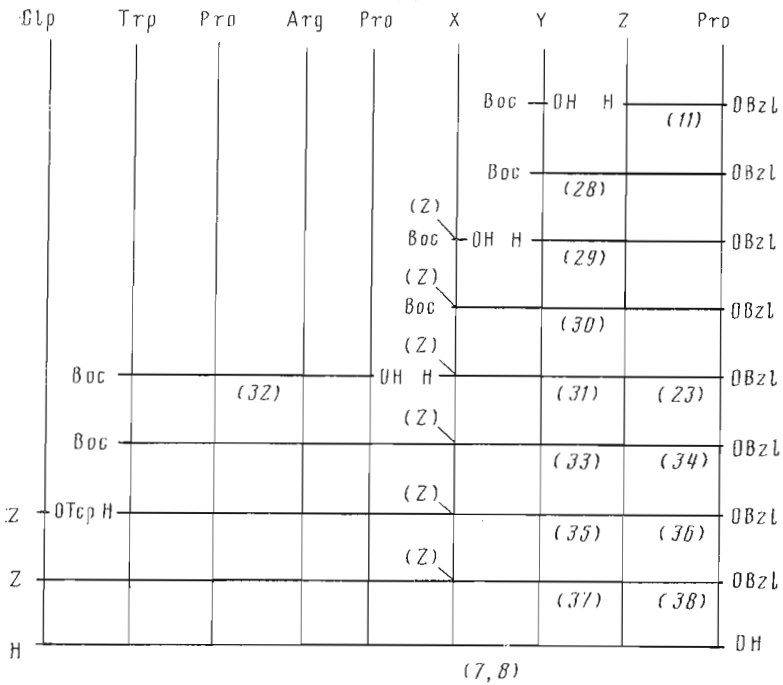
Схема 1



(2) : X = Trp, Y = MeAla ; (3) : X = Phe, Y = MeAla ,

(4) : X = Trp, Y = D-Ala

Схема 2



(7) : X = Gln, Y = Ile, Z = MeAla

(8) : X = Lys, Y = Phe, Z = MeAla

Физико-химические характеристики синтезированных соединений

Номер	Соединение	Брутто-формула	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$, град (с 1, MeOH)	Выход, %
(2)	Glp-Lys-Trp-MeAla-Pro-OH	C ₅₁ H ₄₃ N ₇ O ₇	197–203	-69,7	78
(3)	Glp-Lys-Phe-MeAla-Pro-OH	C ₂₉ H ₄₂ N ₆ O ₇	174–177	-74,7	90
(4)	Gpl-Lys-Trp-D-Ala-Pro-OH	C ₃₁ H ₄₁ N ₇ O ₇	198–202	-31,9	62 1*
(7)	Glp-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-MeAla-Pro-OH	C ₅₂ H ₇₆ N ₁₄ O ₁₂	230–231	-94,7	60 1*
(8)	Glp-Trp-Pro-Arg-Pro-Lys-Phe-MeAla-Pro-OH	C ₅₆ H ₇₈ N ₁₄ O ₁₁	210–220	-78,0	90
(9)	Boc-MeAla-Pro-OBzl	C ₂₁ H ₃₀ N ₂ O ₅	Аморфное	-114,0 -131,0 2*	90
(10)	Boc-D-Ala-Pro-OBzl	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	»	-31,6	89,7
(11)	HCl-MeAla-Pro-OBzl	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₃ Cl	202–203	-107,6	97
(12)	HCl-D-Ala-Pro-OBzl	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₃ Cl	73–75	-59,7	74
(13)	Boc-Trp-MeAla-Pro-OBzl	C ₃₂ H ₄₆ N ₄ O ₆	Аморфное	-77,1 2*	52 3* 70 4*
(14)	Boc-Phe-MeAla-Pro-OBzl	C ₃₀ H ₃₉ N ₃ O ₆	»	-81,2	55 3* 83 4*
(15)	Boc-Trp-D-Ala-Pro-OBzl	C ₃₁ H ₃₈ N ₄ O ₆	70–74	-25,8	82
(16)	HCl-Trp-MeAla-Pro-OBzl	C ₂₇ H ₃₃ N ₄ O ₄ Cl	115–130	-33,9 2*	98
(17)	HCl-Phe-MeAla-Pro-OBzl	C ₂₅ H ₃₂ N ₃ O ₄ Cl	85–90	-64,2 2*	86
(18)	CF ₃ COOH-Phe-MeAla-Pro-OBzl	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₆ F ₃	64–68	-66,6	100
(18)	HCl-Trp-D-Ala-Pro-OBzl	C ₂₆ H ₃₁ N ₄ O ₄ Cl	129–136	+3,85	78
(19)	Boc-Lys(Z)-Trp-MeAla-Pro-OBzl	C ₄₆ H ₅₈ N ₆ O ₉	78–80	-68,1	45 1*
(20)	Boc-Lys(Z)-Phe-MeAla-Pro-OBzl	C ₄₄ H ₅₇ N ₅ O ₉	Аморфное	-76,2	62 1*
(21)	Boc-Lys(Z)-Trp-D-Ala-Pro-OBzl	C ₄₅ H ₅₆ N ₆ O ₉	»	-29,4	78 1*
(22)	HCl-Lys(Z)-Trp-MeAla-Pro-OBzl	C ₄₁ H ₅₁ N ₆ O ₇ Cl	105–110	-18,1	100
(23)	HCl-Lys(Z)-Phe-MeAla-Pro-OBzl	C ₃₉ H ₅₀ N ₅ O ₇ Cl	80–84	-42,4	87
(24)	HCl-Lys(Z)-Trp-D-Ala-Pro-OBzl	C ₄₆ H ₅₉ N ₆ O ₇ Cl	149–153	-1,26 -7,4 (с 0,7, DMF)	78,8
(25)	Z-Glp-Lys(Z)-Trp-MeAla-Pro-OBzl	C ₅₄ H ₆₁ N ₇ O ₁₁	90–95	-85,6	54,5 1*
(26)	Glp-Lys(Z)-Phe-MeAla-Pro-OBzl	C ₄₄ H ₅₄ N ₆ O ₉	75–85	-72,6	62 1*
(27)	Z-Clp-Lys(Z)-Trp-D-Ala-Pro-OBzl	C ₅₃ H ₅₉ N ₇ O ₁₁	98–100	-50,0	43 1*
(28)	Boc-Ile-MeAla-Pro-OBzl	C ₂₇ H ₄₁ N ₃ O ₅	Масло	-164,8	55 3* 50 4*
(29)	HCl-Ile-MeAla-Pro-OBzl	C ₂₂ H ₃₁ N ₃ O ₄ Cl	88–91	-101,8	96
(29)	CF ₃ COOH-Ile-MeAla-Pro-OBzl	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₆ F ₃	Аморфное	-105,2	90
(30)	Boc-Gln-Ile-MeAla-Pro-OBzl	C ₃₂ H ₄₉ N ₅ O ₈	118–121	-118,4	71,5
(31)	HCl-Gln-Ile-MeAla-Pro-OBzl	C ₂₇ H ₄₂ N ₅ O ₆ Cl	Аморфное	-76,3	90
(31)	CF ₃ COOH-Gln-Ile-MeAla-Pro-OBzl	C ₂₉ H ₄₂ N ₅ O ₈ F ₃	»	-81,0	80
(33)	Boc-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-MeAla-Pro-OBzl	C ₅₉ H ₈₆ N ₁₃ O ₁₂ Cl	149–156	-114,6	54 1*
(34)	Boc-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Lys(Z)-Phe-MeAla-Pro-OBzl	C ₇₁ H ₉₄ N ₁₃ O ₁₃ Cl	131–134	-84,7	35 1*
(35)	HCl-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-MeAla-Pro-OBzl	C ₅₄ H ₇₉ N ₁₃ O ₁₀ Cl ₂	189–192	-104,2	100
(36)	HCl-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Lys(Z)-Phe-MeAla-Pro-OBzl	C ₆₆ H ₈₇ N ₁₃ O ₁₁ Cl ₂	157–161	-65,0 2*	97
(37)	Z-Glp-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-MeAla-Pro-OBzl	C ₆₇ H ₈₉ N ₁₄ O ₁₄ Cl	163–168	-52,8	75 1*
(38)	Z-Glp-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Lys(Z)-Phe-MeAla-Pro-OBzl	C ₇₆ H ₉₇ N ₁₄ O ₁₅ Cl	155–159	-93,8	42 1*

1* Выход приведен после хроматографической очистки.

2* Измерено в этаноле.

3* Получено DCC-НОВТ-методом.

4* Получено методом ОРФ-эфиров.

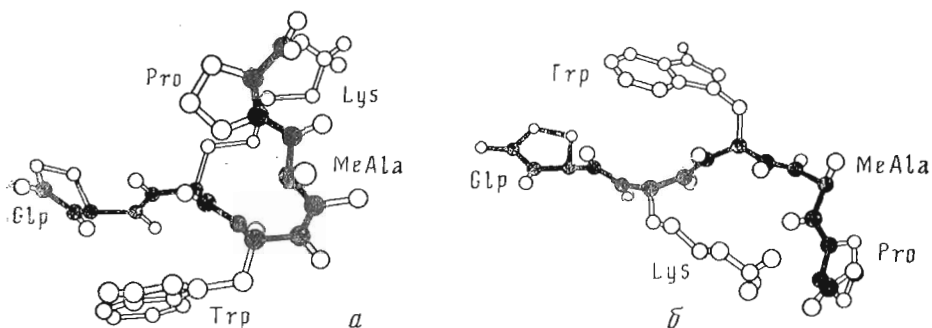


Рис. 2. Типичные представители различных групп структур соединения (2): конформации 1 (а) и 2 (б) (табл. 2)

трипептиды (13), (14) и (28) были получены с выходами 70, 83 и 50% соответственно.

С-Концевой дипептид, Вос-MeAla-Pro-OBzl, получали карбодимидным методом в присутствии НОВТ в условиях, позволяющих избежать рацемизации [11]. Получение этого дипептида методом смешанных ангидридов привело к продукту с более низкой оптической чистотой.

В ходе дальнейшего наращивания пептидной цепи было отмечено, что на уровне три- и тетрапептидов удаление Вос-группы с помощью HCl в уксусной кислоте, диоксане или эфире сопровождается появлением на электрофорезе дополнительного пятна. Preparative разделение на электрофорезе реакционной смеси и идентификация побочного продукта позволили заключить, что деблокирование пептидов в этих условиях сопровождается расщеплением связи MeAla-Pro и образованием Pro-OBzl с выходом до ~10%. При снятии Вос-группы действием трифторуксусной кислоты образования H-Pro-OBzl не наблюдалось.

Все промежуточные защищенные три- и тетрапептиды подвергали очистке на силикагеле, а защищенные пента-, окта- и нонапептиды — на сефадексе LH-20 в метаноле. Соединения (2)–(4), (7) и (8) очищали хроматографией на биогеле Р-2 или сефадексе G-15 в 2% уксусной кислоте.

Все синтезированные пента- и нонапептиды были исследованы по способности ингибировать пептидилдипептидазу из легких свиньи*. Оказалось, что активность этих соединений на 3–4 порядка ниже активности эффективного ингибитора пептидилдипептидазы тепротид (5).

Теоретический конформационный анализ аналогов (2) и (4) позволил выявить структуры пептидного остова, энергии которых удовлетворяют критерию $\Delta U = U - U_{\min} \leq 7,5$ ккал/моль (табл. 2). Можно отметить прежде всего, что конформационная подвижность аналога (2) резко ограничена по сравнению с аналогом (4), хотя наличие в первом случае *цис*-конфигурации связи Trp-MeAla является фактором, увеличивающим конформационную подвижность аналога (2). Из табл. 2 видно также, что многие описанные в ней структуры — квазициклические, допускающие сближение ϵ -аминогруппы остатка Lys² и С-концевого карбоксила: таким образом, «конформационно жесткими» элементами в обоих аналогах можно считать С-концевые тетрапептиды. Пространственная организация С-концевого тетрапептида соединения (2) практически одинакова у всех структур, приведенных в табл. 2: конформации 1, 4 и 5, а также 2 и 3 различаются лишь пространственным расположением остатка Glp относительно остальной части молекулы; структура обеих групп конформаций 1, 4, 5 и 2, 3 весьма сходна (ср. рис. 2а, б). Пространственная организация структур типов 1, 2 и 3 соединения (4) (табл. 2) также весьма сходна; к этой же группе структур можно отнести конформации 7 и 8, которые легко получить из конформаций 1 и 2

* Ингибирующая активность была определена в Институте биологически активных веществ АН ГДР В. Е. Симсом и Г. Гедером.

Низкоэнергетические структуры аналогов (2) и (4)

Соединение	Номер структуры	Структура *	Двугранные углы, град														ΔU , ккал/моль	$T_{N^{\oplus}Lys-COO, \text{ \AA}}$
			Gip		Lys				Tgp			D-Ala, MeAla		Pro				
			ϕ	ψ	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4	ϕ	ψ	χ_1	χ_2	ϕ	ψ	ϕ	ψ		
(2)	1	RBB \hat{B} B	-130	139	-163	-162	-161	-160	-141	103	-59	-85	-110	147	139	0,00	3,24	
	2	BBBLB	-129	146	-157	-130	173	-173	-121	144	-62	-93	59	113	141	3,61	3,21	
	3	BBBLB	-130	148	-160	-133	170	-178	-114	142	-65	-94	55	101	139	4,58	3,27	
	4	BBB \hat{B} R	-136	148	-167	-121	178	174	-140	107	-48	-88	-122	140	-42	6,07	4,47	
	5	BLBB \hat{B}	50	101	-168	-114	166	175	-114	119	-56	-89	-104	148	128	7,46	3,33	
(4)	1	RBBHR	-135	142	-109	-151	173	-165	-138	94	-54	-89	116	-127	-44	0,00	3,41	
	2	BBBHR	-129	149	-104	-161	165	-161	-134	87	-54	-90	115	-127	-43	0,79	3,40	
	3	BBQHB	-127	146	-95	-158	167	-160	-124	119	-59	-92	149	-110	158	1,77	3,71	
	4	BBBRR	-129	142	-139	-82	162	-162	-123	167	-56	-91	-26	-85	-44	1,80	6,80	
	5	BBBRR	-137	141	-155	-101	178	-83	-129	174	-60	-92	-19	-86	-47	2,69	6,84	
	6	RBQHR	-136	126	-154	78	179	170	-113	-8	-65	-94	158	-93	-35	2,86	3,78	
	7	RRLHR	-115	-39	-80	-167	143	-72	48	42	-53	-74	151	-128	-39	3,43	6,56	
	8	BRLHR	-173	-24	-82	-178	139	-73	50	39	-55	-72	150	-133	-40	4,77	7,04	
	9	BBLHB	-142	97	-55	111	-105	144	44	36	-60	-85	144	-107	131	6,39	11,72	
	10	RBBRR	-134	140	-127	-165	-180	-147	-140	-55	-51	-89	-59	-109	159	7,59	3,07	

* Минимум Q характеризуется значением угла $\psi \sim 0^\circ$; знак « ^ » указывает на *cis*-конфигурацию остатка MeAla.

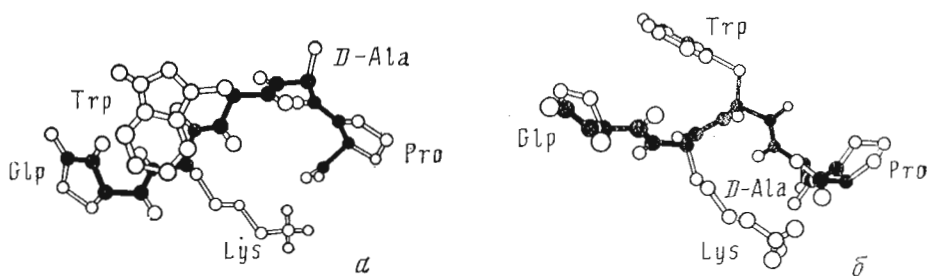


Рис. 3. Типичные представители различных типов структур соединения (4): конформации 1 (а) и 3 (б) (табл. 2)

поворотом \sim на 180° плоскости пептидной связи $\text{Lys}^2\text{-Trp}^3$, и конформацию 10, которая получается из конформации 1 аналогичным поворотом плоскости пептидной связи между остатками Trp^3 и D-Ala^4 . После поворота плоскости той же пептидной группы на 180° конформации 4 и 5 приобретают определенное сходство с конформацией 3, хотя в этом случае значение угла ψ остатка Trp^3 смещается в область более отрицательных значений. Таким образом, и в случае соединения (4) многие низкоэнергетические конформации молекулы объединяются в две сходные по пространственной организации группы структур: конформации 1, 2, 3, 7, 8, 10 и 3–5 (рис. 3а, б).

Пентапептидные аналоги, рассматриваемые в настоящей работе, не несут каких-либо боковых цепей, отличных от таковых в природном пептиде (различие $\text{Trp}^3\text{-Phe}^3$ несущественно). Это обстоятельство позволяет предполагать, что малая способность этих аналогов к ингибированию АПФ обусловлена исключительно конформационными факторами. Поэтому в результате настоящей работы можно, по-видимому, сформулировать такой вывод: поскольку способность ингибировать АПФ у исследованных пептидов резко понижена, «конформации ингибирования» пептидного остова пентапептида (1) наверняка не содержатся среди структур, описанных в табл. 2. Этот вывод полностью соответствует результатам, полученным ранее в работах [3] и [5], что косвенно подтверждает их правоту. Интересно отметить также, что конформация *RBBLR* содержится среди низкоэнергетических структур аналога (2); в то же время именно этот конформер считается, по мнению авторов работы [5], ответственным за «потенцирующее» действие соединения (4). Следовательно, тестирование брадикининпотенцирующего действия аналога (2) могло бы послужить экспериментальной проверкой выводов работы [5] в отношении «потенцирующей» структуры VPR_{5a} .

Что касается аналогов теспротида, содержащих MeAla в положении 8, то их конформационный расчет является весьма трудоемкой процедурой и проведение его представлялось нам нецелесообразным. Тем не менее резкое снижение ингибирующей способности аналогов (6) и (7), имеющих в положении 8 остатки Ala^* или MeAla вместо пролина, в принципе может быть также интерпретировано в терминах изменений локальных стерических условий остова (см., например, [4]): появлении конформации типа *L* в положении 8 либо стабилизации *транс*-конфигурации пептидной связи между остатками 7–8.

Экспериментальная часть

Индивидуальность полученных соединений проверяли ТСХ на пластинках (Merck, Silicagel 60F₂₅₄) в системах *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 13:2:5 и 5:3:2 (А и Б), *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 5:5:1:3 (В), хлороформ — метанол, 9:1 (Г), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 8:1:1 (Д) и электрофорезом на

* Аналог $[\text{Ala}^8]$ теспротид синтезирован ранее в Университете им. Ф. Шиллера (г. Нена, ГДР) З. Рейссманном.

бумаге FN-17 в горизонтальном приборе при градиенте потенциала $24 \text{ В} \cdot \text{см}^{-1}$ в 1 М ацетатном (рН 2,4) и пиридинацетатном буфере (рН 5,5). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40—100 мкм (Chemapol, Чехословакия).

Температуры плавления (не исправлены) определяли на нагревательном столике Voetius (ГДР), оптическое вращение — на поляриметре Perkin-Elmer, модель 241 (США). Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных в запаянных ампулах 6 н. HCl при 110°C в течение 24 ч, выполняли на автоматическом аминокислотном анализаторе AAA 881 Microtechno Prag (ЧССР). Содержание триптофана определяли спектрофотометрически [12]. Растворы пептидов, в тех случаях, где это указано, промывали 8% NaHCO_3 , водой, 1% H_2SO_4 и снова водой. Растворы высушивали над MgSO_4 и упаривали в вакууме при температуре не выше 40°C . Выходы и константы полученных соединений приведены в табл. 1.

1. *Вос-MeAla-Pro-OBzl (9)*. К раствору 0,84 г (4,16 ммоль) Вос-MeAla-OH [13] в 2 мл DMF добавляли 1,1 г (4,55 ммоль) HCl·Pro-OBzl и 1,12 г (8,3 ммоль) НОВТ, охлаждали до $0 - -5^\circ \text{C}$ и приливали 0,58 мл (4,16 ммоль) триэтиламина и охлажденный раствор 0,94 г (4,56 ммоль) DCC в 3 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при -5°C и 18 ч при 20°C , приливали 100 мл этилацетата, отфильтровывали осадок, раствор промывали, сушили, упаривали и получали защищенный дипептид (9) в виде масла.

2. *HCl·MeAla-Pro-OBzl (11)*. К раствору 0,8 г (2,05 ммоль) Вос-MeAla-Pro-OBzl в 4 мл абс. диоксана приливали 4 мл 5 н. HCl в диоксане, выдерживали 30 мин при 18°C и упаривали. Остаток растирали с абс. эфиром, хлоридрат дипептида (11) отфильтровывали и высушивали в вакууме.

3. *Вос-Trp-MeAla-Pro-OBzl (13)*. К суспензии 0,837 г (2,75 ммоль) Вос-Trp-OH, 0,99 г (3,03 ммоль) хлоридрата дипептида (11) и 0,74 г (5,5 ммоль) НОВТ в 5 мл тетрагидрофурана, охлажденной до -5°C , приливали 0,39 мл (2,76 ммоль) триэтиламина и охлажденный раствор 0,62 г (3,02 ммоль) DCC в 5 мл тетрагидрофурана. Перемешивали 30 мин при -5°C и 18 ч при 20°C . Отфильтровывали выпавший осадок, растворитель упаривали, остаток растворяли в этилацетате, раствор промывали, сушили, упаривали и остаток хроматографировали на силикагеле в градиенте концентрации метанола в хлороформе (хлороформ \rightarrow 1% метанол в хлороформе).

4. *Вос-Lys(Z)-Trp-MeAla-Pro-OBzl (19)*. К охлажденному до 0°C раствору 0,76 г (1,48 ммоль) хлоридрата трипептида (16) (полученного из 0,77 г трипептида (13) в условиях опыта 2 присутствии 1,5 мл анизола) и 0,726 г (1,295 ммоль) Вос-Lys(Z)-ОТср в 3,5 мл DMF приливали 0,36 мл (2,6 ммоль) триэтиламина, перемешивали 15 мин при этой температуре и выдерживали 18 ч при 20°C . Приливали 40 мл этилацетата, раствор промывали, сушили, растворитель упаривали и остаток хроматографировали на силикагеле (хлороформ — 1% метанол в хлороформе, градиентная элюция).

5. *Z-Glp-Lys(Z)-Trp-MeAla-Pro-OBzl (25)*. К охлажденному до 0°C раствору 0,35 г (0,443 ммоль) хлоридрата тетрапептида (22) (полученному из защищенного тетрапептида (19) в условиях опыта 2 в присутствии 0,3 мл анизола) и 0,24 г (0,542 ммоль) Z-Glp-ОТср в 1 мл DMF приливали 0,125 мл (0,89 ммоль) триэтиламина и выдерживали 20 ч при 20°C . Добавляли 30 мл этилацетата, раствор промывали, сушили, упаривали и остаток очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле.

6. *Glp-Lys-Trp-MeAla-Pro-OH (2)*. 0,02 г (0,02 ммоль) защищенного пентапептида (25) гидрировали в метаноле над Pd-чернью в течение 8 ч, отфильтровывали катализатор, упаривали и остаток переосаждали из метанола эфиром. Выпавший осадок пентапептида (2) отфильтровывали и очищали на биогеле Р-2 в 2% уксусной кислоте. Аминокислотный анализ: Glu 1,02; Pro 0,96; Lys 0,99; Trp 0,97.

7. *Woc-Phe-MeAla-Pro-OBzl (14)*. К охлажденной до 0° С суспензии 2,07 г (6,34 ммоль) $\text{HCl} \cdot \text{MeAla-Pro-OBzl}$ и 2,47 г (5,73 ммоль) Woc-Phe-OPfp в 10 мл DMF приливали 1,78 мл (12,71 ммоль) триэтиламина, перемешивали 15 мин при -5° С и 20 ч при 20° С, поддерживая pH реакционной смеси не ниже 8. Приливали 100 мл этилацетата, раствор промывали, сушили, растворитель упаривали и остаток хроматографировали на силикагеле в системе гексан — хлороформ, 3 : 2.

8. *CF₃COOH · Phe-MeAla-Pro-OBzl (17)*. 2,57 г (4,785 ммоль) трипептида (14) растворяли в 12,7 мл трифторуксусной кислоты, выдерживали 30 мин при 18° С и упаривали. К остатку несколько раз приливали абсолютный эфир, упаривали и получали трифторацетат трипептида (17) в виде масла.

9. *Woc-Lys(Z)-Phe-MeAla-Pro-OBzl (20)*. Из 0,48 г (0,871 ммоль) трифторацетата трипептида (17), 0,53 г (0,947 ммоль) Woc-Lys(Z)-OTcp и 0,245 мл (1,75 ммоль) триэтиламина в 2 мл DMF в условиях опыта 4 получали защищенный тетрапептид (20).

10. *Glp-Lys(Z)-Phe-MeAla-Pro-OBzl (26)*. Из 0,3 г (0,407 ммоль) хлоргидрата тетрапептида (23), полученного из 0,37 г защищенного тетрапептида (20) в условиях опыта 2, 0,157 г (0,51 ммоль) Glp-OTcp и 0,115 мл (0,82 ммоль) триэтиламина в 1 мл DMF в условиях опыта 5 получали защищенный пентапептид (26).

11. *Glp-Lys-Phe-MeAla-Pro-OH (3)* получали из 0,05 г (0,061 ммоль) защищенного пентапептида (26) в условиях опыта 6. Аминокислотный анализ: Glu 0,97; Pro 1,08; Phe 1,08; Lys 0,96.

12. *Woc-D-Ala-Pro-OBzl (10)*. Из 0,55 г (2,276 ммоль) $\text{HCl} \cdot \text{Pro-OBzl}$ и 0,392 г (2,074 ммоль) Woc-D-Ala-OH в условиях опыта 1 получали защищенный дипептид (10) в виде масла.

13. *Woc-Trp-D-Ala-Pro-OBzl (15)*. Из 0,27 г (0,864 ммоль) хлоргидрата дипептида (12), полученного из защищенного дипептида (10) в условиях опыта 2, и 0,376 г (0,77 ммоль) Woc-Trp-OTcp в условиях опыта 4 получали защищенный трипептид (15), который очищали хроматографией на силикагеле в системе гексан — хлороформ, 3 : 2.

14. *Woc-Lys(Z)-Trp-D-Ala-Pro-OBzl (21)*. Из 0,5 г (1,01 ммоль) хлоргидрата трипептида (18), полученного из защищенного трипептида (15) в условиях опыта 2 в присутствии анизол, и 0,505 г (0,901 ммоль) Woc-Lys(Z)-OTcp в условиях опыта 4 получали защищенный тетрапептид (21).

15. *Z-Glu-Lys(Z)-Trp-D-Ala-Pro-OBzl (27)*. Из 0,45 г (0,59 ммоль) хлоргидрата тетрапептида (24), полученного из защищенного тетрапептида (21) в условиях опыта 2 в присутствии анизол, и 0,28 г (0,632 ммоль) Z-Glu-OTcp в условиях опыта 5 получали защищенный пентапептид (27).

16. *Glu-Lys-Trp-D-Ala-Pro-OH (4)* получали из 0,115 г защищенного пентапептида (27) в условиях опыта 6. Аминокислотный анализ: Glu 0,99; Pro 1,05; Lys 1,08; Ala 0,97; Trp 0,97.

17. *Woc-Ile-MeAla-Pro-OBzl (28)*. Из 0,71 г (2,17 ммоль) хлоргидрата дипептида (11), 0,45 г (1,95 ммоль) Woc-Ile-OH , 0,6 г (4,45 ммоль) NOBT , 0,30 мл (2,17 ммоль) триэтиламина и 0,45 г (2,18 ммоль) DCC в 10 мл тетрагидрофурана в условиях опыта 3 получали защищенный трипептид (28), который очищали хроматографией на силикагеле в системе хлороформ — гексан, 3 : 2.

18. *Woc-Gln-Ile-MeAla-Pro-OBzl (30)*. Из 0,388 г (0,75 ммоль) трифторацетата трипептида (29), полученного из защищенного трипептида (28) в условиях опыта 8, и 0,29 г (0,73 ммоль) Woc-Gln-OPfp в 2 мл DMF в присутствии 0,2 мл (1,5 ммоль) триэтиламина в условиях опыта 7 получали защищенный тетрапептид (30), который переосаждали из этилацетата петролейным эфиром или очищали хроматографией на силикагеле, элюировали ступенчатым градиентом метанола в хлороформе (хлороформ — 2% метанол в хлороформе).

19. *Woc-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-MeAla-Pro-OBzl (33)*. К раствору 0,23 г (0,351 ммоль) $\text{Woc-Trp-Pro-Arg-Pro-OH}$ [14] и 0,2 г (0,361 ммоль) хлоргидрата тетрапептида (31), полученного из 0,29 г защищенного тетрапептида (30) в условиях опыта 2, в 3 мл свежеперегнанного хлороформа

прибавляли 0,11 г (0,455 ммоль) EEDQ и выдерживали реакционную смесь 48 ч при 20° С. Растворитель упаривали, остаток переосаждали из метанола этилацетатом и хроматографировали на сефадексе LH-20 в метаноле.

20. *Z-Glp-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-MeAla-Pro-OBzl (37)*. К раствору 0,108 г (0,096 ммоль) хлоргидрата октапептида (35), полученного из 0,114 г защищенного октапептида (33) в условиях опыта 2 в присутствии 0,2 мл анизолла, и 0,0554 г (0,125 ммоль) *Z-Glp-OTer* в 0,3 мл DMF прибавляли 0,014 мл (0,10 ммоль) триэтиламина и выдерживали 48 ч при 20° С. Добавляли 10 мл этилацетата, выдерживали несколько часов при 0–5° С и отфильтровывали. Получали 0,12 г нонапептида (37), который очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле.

21. *Glp-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-MeAla-Pro-OH (7)*. 0,0610 г (0,457 ммоль) нонапептида (37) гидрировали в метаноле над Pd-чернью в течение 12 ч. Отфильтровывали катализатор, растворитель упаривали и остаток переосаждали из метанола эфиром. Выделяли 0,0402 г свободного нонапептида (7), который очищали на биогеле P-2 в 2% уксусной кислоте. Аминокислотный анализ: Glu 2,06; Pro 3,08; Arg 0,97; Ile 0,96; Trp 0,96.

22. *Woc-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Lys(Z)-Phe-MeAla-Pro-OBzl (34)*. Из 0,176 г (0,24 ммоль) хлоргидрата тетрапептида (23) и 0,16 г (0,24 ммоль) *Woc-Trp-Pro-Arg-Pro-OH* и 0,07 г (0,283 ммоль) EEDQ в 1 мл хлороформа в условиях опыта 19 получали защищенный октапептид (34).

23. *Z-Glp-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Lys(Z)-Phe-MeAla-Pro-OBzl (38)*. Из 0,085 г (0,063 ммоль) хлоргидрата октапептида (36), полученного из защищенного октапептида (34) в условиях опыта 2 в присутствии анизолла, и 0,03 г (0,0677 ммоль) *Z-Glp-OTer* в условиях опыта 20 получали защищенный нонапептид (38).

24. *Glp-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Lys-Phe-MeAla-Pro-OH (8)* получали из 0,015 г (0,01 ммоль) нонапептида (38) в условиях опыта 21. Аминокислотный анализ: Glu 1,07; Pro 3,09; Arg 0,96; Phe 0,98; Lys 1,02; Trp 0,95.

Конформационные расчеты. Теоретический конформационный анализ аналогов соединения (I) проводился в попарно-аддитивном приближении с использованием потенциальных функций атом-атомных взаимодействий (функциональные группы типа CN_n считались едиными «атомами») и «жесткой» валентной геометрии, не отличающихся от описанных в работе [15]. Электростатические взаимодействия учитывались в монопольном приближении со значением диэлектрической проницаемости ϵ 3,5, что в определенной степени моделирует условия менее полярного, чем водное окружение, комплекса фермент–ингибитор (см. также [16]), ионогенные группы молекул — ϵ -аминогруппа остатка Lys² и C-концевой карбоксил считались ионизированными. С целью более адекватного учета реальных атом-атомных взаимодействий и учитывая «жесткость» отталкивательной части потенциалов [15], описывающих взаимодействия с участием метильной группы, «атом» CH_3 группы N- CH_3 MeAla при расчете был заменен углеродным атомом (см. также [17]). В качестве «стартовых точек» для минимизации конформационной энергии рассматривались все возможные сочетания локальных минимумов остова: *B* и *R* для остатка Glp, *B*, *R* и *L* — для остатка Lys, *B* — для C-концевого остатка Pro, а также *B*, *R* и *L* — для остатка Trp (за исключением минимума *R* в случае аналога (2)) и минимумов *B* и *L* (соответственно *R* и *H*) для предпролиновых остатков Ala (*D*-Ala). Кроме того, для остатков Pro и MeAla учитывалась возможность *цис-транс*-изомеризации; при окончательном подсчете энергии полагалось, что *цис*-конформация проигрывает *транс*-конформации 8,0 ккал/моль в случае Pro [18] и 1,2 ккал/моль в случае MeAla [19]. Таким образом, всего для аналога (4) рассматривалось 72 структуры остова, а для аналога (2) — 96. В каждой из рассмотренных структур остова проводилась оптимизация пространственного расположения боковых цепей по алгоритму, изложенному в [17]; в табл. 2 приведены данные, полученные в результате такой оптимизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ondetti M. A., Rubin V., Cushman D. W. *Science*, 1977, № 4288, p. 441-443.
2. Cushman D. W., Cheung H. S., Sabo E. F., Rubin V., Ondetti M. A. *Fed. Proc.*, 1979, v. 38, № 13, p. 2778-2782.
3. Лиепиня И. Т., Полевая Л. К., Чипенс Г. И. В кн.: Конформации и функции биологических молекул. Теоретические аспекты. / Ред. Чипенс Г. И. Рига: Зинатне, 1984, с. 24-35.
4. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. Конформации пептидных биорегуляторов. М.: Медицина, 1983. 190 с.
5. Попов Е. М., Севастьянова Н. Н. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 10, с. 1478-1486.
6. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.*, 1974, v. 40, № 1, p. 291-308.
7. Cushman D. W., Pluscec J., Williams N. I., Weaver E. R., Sabo E. F., Kosy O., Cheung H. S., Ondetti M. A. *Experientia*, 1973, v. 29, № 8, p. 1032-1035.
8. Harris R. B., Ohlsson J. T., Wilson I. B. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1981, v. 206, № 1, p. 105-112.
9. Раедель Г. А., Монапова Н. Н., Крит Н. А., Филатова М. П., Лисункин Ю. И., Леанов В. Т. *Химия природы. соедин.*, 1975, № 1, p. 47-56.
10. McDermott J. R., Benoiton N. L. *Can. J. Chem.*, 1973, v. 51, № 15, p. 2562-2570.
11. Davies J. S., Mohammed A. K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1981, № 11, p. 2982-2990.
12. Wellaufer D. B. In: *Adv. Protein Chem.* N. Y.-L.: Acad. Press, 1962, v. 17, p. 375-380.
13. Cheung S. T., Benoiton N. L. *Can. J. Chem.*, 1977, v. 55, № 5, p. 906-910.
14. Филатова М. П., Крит Н. А., Ковальчук О. В., Комарова О. М., Рейссманн З. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 7, с. 965-970.
15. Nikiforovich G. V., Leonova V. I., Galaktionov S. G., Chipens G. I. *Int. J. Peptide and Prot. Res.*, 1979, v. 13, № 4, p. 363-373.
16. Nikiforovich G. V., Rozenblit S. A., Chipens G. I. In: *Chemistry of Peptides and Proteins* / Eds Voelter W., Wunsch E., Ovchinnikov J., Ivanov V. B.- N. Y.: Walter de Gruyter & Co., 1982, v. 1, p. 407-414.
17. Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Балодис Ю. Ю. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 2, с. 179-188.
18. Lewis P. N., Momany F. A., Scheraga H. A. *Isr. J. Chem.*, 1973, v. 11, p. 121-152.
19. Manavalan F., Momany F. A. *Biopolymers*, 1980, v. 18, № 11, p. 1943-1973.

Поступила в редакцию
20.III.1985
После переработки
1.VII.1985

SYNTHESIS AND STUDIES OF CONFORMATIONALLY RESTRICTED ANALOGUES OF PEPTIDE INHIBITORS OF THE ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME

FILATOVA M. P., KRIT N. A., KOMAROVA O. M., OREKHOVICH V. N.,
REISSMANN S. *, LIEPINYA I. T. **, NIKIFOROVICH G. V. **

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

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

To investigate conformations of peptide inhibitors of the angiotensin-converting enzyme in the enzyme-inhibitor complex, the synthesis, studies of inhibitory activity, and conformational calculations of analogues of bradykinin-potentiating peptides with N-methylalanine or D-alanine in place of L-proline or L-alanine residues have been carried out. All the analogues showed a sharp decrease of inhibitory activity in comparison with the natural peptides, that might be considered as an indirect confirmation of the earlier proposed «conformation of inhibition» of the above-mentioned peptides.