

Союз Советских
Социалистических
Республик



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

Взамен ранее изданного

(11) 687794

(61) Дополнительное к авт. свид-ву —

(22) Заявлено 14.12.77 (21) 2555681/23-04

с присоединением заявки № —

(23) Приоритет —

Опубликовано 23.05.81. Бюллетень № 19

Дата опубликования описания 28.05.81

(51) М. Кл.³
С 07 С 103/52
А 61 К 37/02

(53) УДК 547.964.
.4.07(088.8)

(72) Авторы
изобретения

Ю. Е. Анцан, Н. А. Макарова, И. П. Мисиня и Г. И. Чипенс

(71) Заявитель

Ордена Трудового Красного Знамени институт
органического синтеза АН Латвийской ССР

(54) ОКТАПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ СПОСОБНОСТЬЮ
СПЕЦИФИЧЕСКИ ИНГИБИРОВАТЬ ПРЕССОРНЫЙ
ЭФФЕКТ И МИОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ АНГИОТЕНЗИНА II

1

Изобретение относится к синтезу нового соединения — октапептида, обладающего способностью специфически ингибировать прессорный эффект и миотропное действие ангиотензина II, которое может найти применение в медицине.

Известные специфические антагонисты ангиотензина II представляют собой аналоги ангиотензина II, модифицированные или только в положении 8, или в положениях 8 и 1 одновременно. Модификация в положении 8 согласно литературным данным является обязательной для проявления антагонистических свойств. Замена также аспарагиновой кислоты в первом положении на аминокислотные остатки, устойчивые к действию аминопептидаз, приводит к аналогам антагонистов, обладающим пролонгированным эффектом, без изменения характера их действия.

Известные антагонисты ангиотензина II в настоящее время применяются только лишь для диагностики различных форм гипертонического заболевания, более широко их использованию для терапевтических

2

полураспада в организме и весьма значительная их прессорная активность [2].

Так, например, известный антагонист — (8-изолейцин)-ангиотензин обладает 1—1,5% прессорной активностью природного гормона [1].

5 Кроме того, анализ имеющегося экспериментального материала показывает, что модификация аминокислотных остатков молекулы в положениях 1 и 8 недостаточна для получения антагонистов, пригодных для терапевтических целей.

10 Цель изобретения — новый октапептид, способный специфически ингибировать прессорный эффект и миотропное действие ангиотензина II, расширение арсенала средств воздействия на живой организм.

15 Для этого предлагается октапептид формулы I:

L—Asp—L—Arg—aza— α^1 —homo—L—Val—

20 —Tyr—L—Val—L—His—L—Pro—L—Ile

Соединение 1 отличается от известного антагониста (8-изолейцин) ангиотензина II

кацией остова пептидной цепи — наличием дополнительной NH-группы между C^α и карбонильным углеродным атомом в остатке валина в положении 3. Однако это неожиданно усиливает антагонистическое действие этого аналога гормона и снижает нежелательный прессорный эффект.

Предлагаемое соединение было синтезировано путем конденсации (согласно схеме) отдельных фрагментов при использовании известных методов пептидной химии (например азидного, карбодиимидного и пр.) [3].

Трет-бутоксикарбонилгидразид бензилоксикарбонил-аспарагинил-N⁶-нитроаргинил-валина (4) (см. схему 1) получают карбодиимидным методом, конденсируя бензилоксикарбониласпарагинил-N⁶-нитроаргинин (2) с трет-бутоксикарбонилгидразидом валина (3) в присутствии двух молей I-гидроксibenзотриазола. Защиту гидразидной функции — трет-бутоксикарбонильную группу соединения (4) — отщепляют трифторуксусной кислотой при комнатной температуре. Азид (6), полученный по методу Рудингера из гидразида (5), выдерживают в растворе диметилформамида 1 ч при 50°C. В таких условиях происходит полная перегруппировка азидов в изоцианаты (7), который без выделения вводят в реакцию с аминокислотой (8). Защитные группы у полученного октапептида (9) удаляют каталитическим гидрогенолизом. Диацетат аспарагинил-аргинил-аза-4'-гомовалилтирозил-гистидил-пролил-фенилаланина (1) чистят, экстрагируя н-бутанолом из водного раствора. Получают соединение 1 хроматографически и электрофоретически однородное, данные аминокислотного анализа продуктов кислотного гидролиза подтверждают наличие аминокислот, входящих в последовательность октапептида (1), в ожидаемых соотношениях.

Пример. В работе используют аминокислоты L-ряда. Органические растворители чистят согласно общепринятым методам. Растворители упаривают на ротационном испарителе при остаточном давлении 12—15 мм рт. ст. и температуре бани 30—40°C.

Температуру плавления (или разложения) соединений определяют в открытых капиллярах без исправления. Удельное оптическое вращение измеряют на цифровом поляриметре «Perkin Elmer» (модель 141). Электрофорез проводят на бумаге FN—16 (ГДР) в 30%-ной уксусной кислоте (pH 1,9) при 18 В/см, электрофоретическую подвижность соединений приводят по отношению к гистидину (E_{His}).

Для нисходящей хроматографии применяют бумагу FN—3 (ГДР) и следующие системы: н-бутанол—пиридин—уксусная кислота—вода при соотношении соответственно 30:20:6:24 (А); н-бутанол—уксусная кислота—вода при соотношении 5:1:2 (Б).

Хроматографию в тонком слое (ТСХ) проводят на пластинках «Silufol» фирмы «Kava-

lier» (Чехословакия) в системах этилацетат—пиридин—уксусная кислота—вода при соотношении 5:5:1:3 (В); хлороформ—метанол—вода при соотношении 40:30:5 (Г); н-бутанол—изо-пропанол—вода—хлоруксусная кислота при соотношении 65—15:20:3 (Д); н-бутанол—уксусная кислота—вода при соотношении 4:1:1 (Е); и хлороформ—этанол—этилацетат—вода при соотношении 5:5:1,5:0,5 (Ж).

Вещества на хромато- и электрофореграммах в зависимости от структуры соединения обнаруживают нингидрином и реактивами Паули, Сакагучи, Рейнделя-Хоппе и Бартона. Для элементного анализа вещества высушивают в пистолете Фишера в течение 24 ч над пятиокисью фосфора при 60°C и остаточном давлении 0,1 мм рт. ст. Кислотный гидролиз пептидов проводят в 6 н. соляной кислоте при 105°C в запаянных ампулах в течение 24 ч. Аминокислотный состав определяют на автоматическом анализаторе ВС—200 фирмы «Biocal» (ФРГ).

Трет-бутоксикарбонилгидразид бензилоксикарбонил-аспарагинил-N⁶-нитроаргинил-валина [3].

К охлажденному до 0°C раствору 11,7 г (25 ммоль) бензилоксикарбонил-аспарагинил-N⁶-нитроаргинина и 6,8 г (50 ммоль) I-гидроксibenзотриазола в 80 мл диметилформамида приливают раствор 5,2 г (25 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 15 мл диметилформамида и выдерживают 1 ч при +2°C. Добавляют 5,8 г (25 ммоль) трет-бутоксикарбонилгидразида валина и смесь выдерживают 24 ч при +2°C. Отфильтровывают дициклогексилмочевину, к фильтрату приливают воду до помутнения (около 120 мл, 60°C) и выдерживают 15 ч при +4°C.

Осадок (дициклогексилмочевину и I-гидроксibenзотриазол) отфильтровывают и фильтрат выливают в смесь, состоящую из 300 мл насыщенного раствора NaCl и 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃. Выпавший мелкий осадок отфильтровывают, промывают водой, затем суспендируют в 300 мл этилацетата. Отфильтровывают, промывают этанолом (50 мл), водой и высушивают в вакууме над P₂O₅ КОН.

Выход 15,8 г, 92%, т. пл. 180—185°C (разл.).

d_4^{22} 22,4/С I, диметилформамид; R_f 0,88 (А); R_f 0,85 (Б) R_f 0,96/(В); R_f 0,78 (Г), E_{His} 0,33 (pH 1,9).

Найдено: %: С 48,81; Н 6,43; N 20,33. Вычислено, %: С 49,40; Н 6,51; N 20,58.

$C_{28}H_{44}N_{10}O_8$

Трифторацетат гидразида бензилоксикарбонил-аспарагинил-N⁶-нитроаргинил-валина (4).

Раствор 13,6 г (20 ммоль) (3) в 50 мл трифторуксусной кислоты выдерживают 30 мин при 20°C, затем в вакууме (12 мм, 20°C) отгоняют 35 мл трифторуксусной кислоты, остаток растирают с эфиром, выпав-

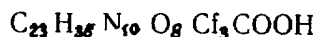
ший в осадок продукт отфильтровывают и сушат в вакууме над P_2O_5/KOH .

Выход 13,5 г (98%), т. пл. 191—193°C (разл.).

$d_4^{22} = 10,3$ (С I, диметилформамид); R_f 0,75 (А), R_f 0,67 (Б), R_f 0,73 (Г), R_f 0,93 (В), E_{HIS} 0,47 (рН 1,9).

Найдено, %: С 43,64; Н 5,57; N 20,34.

Вычислено, %: С 43,22; Н 5,37; N 20,02.

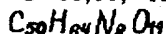


п-Нитробензиловый эфир трет-бутоксикарбонил-О-бензилтирозил-валил-гистидил-пролил-изолейцина (12).

К раствору 6 г (10 ммоль) п-нитробензинового эфира валил-гистидил-пролил-изолейцина в 50 мл (диметилформамида) прибавляют 6 г (12 ммоль) п-нитробензинового эфира трет-бутоксикарбонил-О-бензилтирозина, 0,5 г 1-гидроксibenзотриазола и выдерживают при 20°C 15 ч. К реакционной смеси прибавляют 0,1 мл (3 ммоль) N, N-диэтилендиамина, перемешивают в течение 15 мин и смесь вливают в 400 мл этилацетата и промывают последовательно 15% раствором $KHSO_4$ водой, 10% $NaHCO_3$ водой и высушивают над $Na_2SO_4/MgSO_4$. Растворитель упаривают до объема 50 мл и (12) высаживают в виде аморфного вещества смесью эфир—гексан при соотношении (1:1). Выход 8,2 г (86%), т. пл. 106—109°C $d_4^{22} = 24$ (С I, диметилформамид); R_f 0,78 (Г), R_f 0,57 (Д).

Найдено, %: С 63,24; Н 6,82; N 11,14.

Вычислено, %: С 63,01; Н 6,77; N 11,76.



Дихлоргидрат п-нитробензинового эфира О-бензилтирозил-валил-гистидил-пролил-изолейцина (13).

8 г (8,2 ммоль) (12) растворяют в 50 мл ледяной уксусной кислоты, прибавляют 50 мл 2 н. раствора HCl в уксусной кислоте, выдерживают при 20°C 15 мин, упаривают (30°), остаток растирают с эфиром, отфильтровывают и высушивают над KOH/P_2O_5 .

Выход 7,5 г (96%), т. пл. 138—140°C. $d_4^{22} = 19,9$ (С I, диметилформамид); E_{HIS} 0,66 (рН 2,4), R_f 0,25 (Д).

Найдено, %: С 58,49; Н 6,22; N 12,48.

Вычислено, %: С 58,37; Н 6,31; N 12,01.



п-Нитробензиловый эфир бензилоксикарбонил-аспарагинил-N'-нитроаргинил-аза-гомовалил-О-бензилтирозил-валил-гистидил-пролил-изолейцина (14).

К раствору 2,43 г (3,5 ммоль) (4) в 15 мл диметилформамида прибавляют 2 мл 7 н раствора HCl в диоксане (14 ммоль), реакционную смесь охлаждают до -20°C, прибавляют 0,55 мл (4 ммоль) третбутилнитрита, выдерживают 20 мин при -15°C и вливают в 200 мл охлажденного до -5°C раствора KCl. (При дальнейшей обработке температуру раствора азида поддерживают не выше +3°).

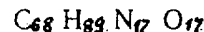
Азид (5) экстрагируют этилацетатом (2 раза по 200 мл), промывают последовательно водой, 5% раствором $NaHCO_3$, водой, высушивают над Na_2SO_4 (10 мин) и упаривают досуха в вакууме (5°C, 0,1 мм рт. ст.) Остаток растворяют в 30 мл диметилформамида, 15 мин встряхивают с измельченными молекулярными ситами А5(2 гр), отфильтровывают и фильтрат выдерживают 1 ч при 50°C (в течение первых 15—20 мин выделяются пузырьки азота). Полученный раствор изоцианата (6) прибавляют к раствору 2,23 г (2 ммоль) трифторацетата п-нитробензинового эфира о-бензилтирозил-валил-гистидил-пролил-фенилаланина (7) и 0,55 мл (4 ммоль) триэтиламина в 12 мл диметилформамида и выдерживают 15 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь выливают в 200 мл воды, объемистый осадок отфильтровывают, промывают последовательно 5% раствором $NaHCO_3$, водой, 5% раствором $KHSO_4$ водой. Влажный продукт суспендируют в 260 мл этилацетата, отфильтровывают, промывают этанолом (30 мл), высушивают и переосаждают из диметилформамида — этанол—вода. Высушивают в вакууме над P_2O_5/KOH .

Выход 1,92 г (62%), считая на аминокомпоненту, т. пл. 187—190°C (разл.).

$d_4^{22} = 22$ (С I, диметилформамид); R_f 0,93 (А), R_f 0,95 (Б), R_f 0,67 (Г); R_f 0,54 (Д); E_{HIS} 0,48 (рН 1,9).

Найдено, %: С 57,94; Н 5,96; N 17,14.

Вычислено, %: С 57,66; Н 6,33; N 16,80.



Аспарагинил-аргинил-аза-гомовалил-тирозил-валил-гистидил-пролил-изолейцин (15).

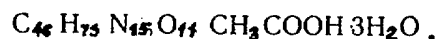
К раствору 1,8 г (1,24 ммоль) (6) в 40 мл смеси метанол—уксусная кислота—вода (6:1:1) прибавляют 1 г палладиевой черни и гидрируют 24 ч, катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают до объема 5 мл приливают 50 мл абсолютного этанола и снова упаривают до объема 5 мл. Упаривание этанола повторяют еще 2 раза, образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают этанолом и эфиром. Полученный продукт растворяют в 100 мл воды и после насыщения н-бутанолом промывают 2 раза по 5 мл н-бутанола и н-бутанолом экстрагируют октапептид (9) (3 раза по 150 мл).

Объединенные экстракты упаривают в вакууме (30°C, 12 мм рт. ст.) (до объема 15 мл, остаток растирают с этанолом, осадок отфильтровывают и высушивают в вакууме над P_2O_5 (KOH при 60°C. Выход 1,1 г (80%), т. пл. 195—197°C (разл.).

$d_4^{22} = 57,9$ (С I, 1 н. CH_3COOH), R_f 0,24 (А), R_f 0,12 (Б), R_f 0,12 (Г); R_f 0,08 (Д); E_{HIS} 0,75 (рН 2,4).

Найдено, %: С 50,76; Н 6,99; N 18,64.

Вычислено, %: С 51,19; Н 7,43; N 18,65.



Аминокислотный состав: A=p 0,9; Aggrg 0,9, Val 1,0; Tyr 0,9; His 1,1; Pro 0,9; Ile 1,0.

Полученные соединения октапептид (1-аспарагин, 3-аза- α -гомовалин, 5-валин, 8-изолейцин) ангиотензин II испытывают на ингибирование специфической миотропной активности ангиотензина II в опытах *in vitro* и понижение его эффекта на кровяное давление крыс в опытах *in vivo*.

Методика исследования.

Миотропные свойства (1-аспарагин, 3-аза- α -гомовалин, 5-валин, 8-изолейцин) ангиотензина II в опытах *in vitro* изучали согласно методике, регистрирующей изотонические сокращения восходящей ободочной кишки (colon ascendens) крыс, являющейся наиболее чувствительным тест-органом для исследования миотропной активности ангиотензина II. Использован прибор ВИ6—5МА в нашей модификации.

Антагонистические свойства изучены в диапазоне концентраций 10^{-10} — 10^{-5} ммол/л, 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 (1-аспарагин, 3-аза- α -гомовалин, 5-валин, 8-изолейцин) ангиотензина II вычислены параметры RA_2 .

В опытах *in vivo* регистрируют кровяное давление у наркотизированных уретаном крыс. После предварительной (1 мин) инъекции исследуемого соединения в дозах 10, 50, 100, 250 и 500 мг/кг животным вводят ангиотензинamid в стандартных дозах 0,05, 0,5 и 5,0 и 25 мг/кг. Антагонизм соединения исследован также при инфузионном его введении 10 и 100 мг/кг/мин в течение 20 мин. Вычислены кривые доза-эффект для ангиотензина в присутствии и в отсутствии антагониста.

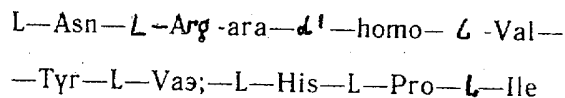
Результаты

В опытах на изолированной восходящей ободочной кишке крыс (1-аспарагин, 3-аза- α -гомовалин, 5-валин, 8-изолейцин) ангиотензин II в концентрациях 10^{-10} — 10^{-5} ммол не проявляет миотропное действие, но в концентрациях порядка 10^{-6} моль вызывает прогрессивное параллельное перемещение кумулятивных кривых концентрация-эффект ангиотензина II в сторону высших концентраций, т. е. проявляет типичный конкурентный антагонизм с ангиотензином. Вычисленные параметры RA_2 составляют $9,70 \pm 0,20$.

В опытах *in vivo* соединение I значительно антагонизирует прессорное действие ангиотензина II. При инъекционном введении (3-аза- α -гомовалин, 8-изолейцин)-ангиотензина в дозе 50 мг/кг требуется 10-кратное увеличение дозы ангиотензина и 100-кратное при дозе 100 мг/кг. Инфузия антагониста со скоростью 10 мг/кг/мин перемещает кривую доза-эффект ангиотензина на 1 порядок (10-кратно), 100 мг/кг/мин — на 2 порядка (100-кратно).

Формула изобретения

Октапептид формулы



обладающий способностью специфически ингибировать прессорный эффект и миотропное действие ангиотензина II.

Источники информации,

принятые во внимание при экспертизе

1. Regoli D., Park W. K., Rioux F. Pharmacology of angiotensin, Pharmacol. Rev., 1974, 26, с. 69.

2. Pettinger W. A., Mitchell H. C. Clinical pharmacology of angiotensin antagonists, Federation Proc., 1976, 35, с. 2521.

3. Шредер Э., Любке К., Пептяды. М., «Мир», 1967, с. 116.

Asp	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Leu
Z	(2) NO_2	H	+	NHNHBOC 131	N ₃	H	ONb
Z	NO_2			NHNHBOC	(8)		ONb
Z	NO_2		BOC BzL	NHNH ₂	(10)		ONb
Z	NO_2		BOC BzL		(11)		ONb
Z	NO_2				(12)		ONb
Z	NO_2	NH-CH-N=C=O CH(CH ₃) ₂	H BzL		(13)		ONb
Z	NO_2	NH-CH-NH-CO CH(CH ₃) ₂	BzL		(14)		ONb
H		NH-CH-NH-CO CH(CH ₃) ₂	(1)				OH

Редактор Л. Письман
Заказ 3.54/50

Корректор В. Волкова
Техред А. Бойкас
Тираж 443

Корректор Г. Назарова
Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5
Филиал ППП «Патент», г. Ужгород, ул. Проектная, 4.