



УДК 547.96

КОНФОРМАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ  
С ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМИ ФЕРМЕНТАМИ.  
СИНТЕЗ ЛИНЕЙНЫХ И ЦИКЛИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ,  
СОДЕРЖАЩИХ ЛЕЙЦИЛТИРОЗИНОВЫЕ  
И ТИРОЗИЛЛЕЙЦИНОВЫЕ ФРАГМЕНТЫ \*

Цетлин В. И., Шепель Е. Н., Иванов В. Т.,  
Овчинников Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР

Для исследования роли конформационных факторов во взаимодействии пептидов с протеолитическими ферментами синтезированы следующие субстраты или ингибиторы: *LL*-, *LD*-, *DL*- и *DD*-стереоизомеры *Ac-Leu-Tyr-X*, *Ac-Tyr-Leu-X* (*X*-*OMe* или *NHMe*), а также ряд циклопептидов цикло(-*L-Leu-L-Tyr-Gly<sub>n</sub>*-) (*n*=4, 6 и 8), цикло(-*L-Leu-L-Tyr-Arn-Arn*) и цикло(-*L-Leu-L-Tyr-Ahx-Ahx*-) \*\*.

Для исследования стереохимических аспектов взаимодействия пептидов с протеолитическими ферментами нами синтезированы серии линейных (1)–(16) и циклических (17)–(21) субстратов или ингибиторов, конформационные параметры которых найдены с помощью разработанных нами ранее методов [2]:

- |   |                                |
|---|--------------------------------|
| (1) <i>Ac-L-Leu-L-Tyr-NHMe</i>                                      | ( 9) <i>Ac-L-Leu-L-Tyr-OMe</i> |
| (2) <i>Ac-L-Leu-D-Tyr-NHMe</i>                                      | (10) <i>Ac-L-Leu-D-Tyr-OMe</i> |
| (3) <i>Ac-D-Leu-L-Tyr-NHMe</i>                                      | (11) <i>Ac-D-Leu-L-Tyr-OMe</i> |
| (4) <i>Ac-D-Leu-D-Tyr-NHMe</i>                                      | (12) <i>Ac-D-Leu-D-Tyr-OMe</i> |
| (5) <i>Ac-L-Tyr-L-Leu-NHMe</i>                                      | (13) <i>Ac-L-Tyr-L-Leu-OMe</i> |
| (6) <i>Ac-L-Tyr-D-Leu-NHMe</i>                                      | (14) <i>Ac-L-Tyr-D-Leu-OMe</i> |
| (7) <i>Ac-D-Tyr-L-Leu-NHMe</i>                                      | (15) <i>Ac-D-Tyr-L-Leu-OMe</i> |
| (8) <i>Ac-D-Tyr-D-Leu-NHMe</i>                                      | (16) <i>Ac-D-Tyr-D-Leu-OMe</i> |
| (17) цикло (- <i>L-Leu-L-Tyr-Gly-Gly-Gly-Gly</i> -)                 |                                |
| (18) цикло (- <i>L-Leu-L-Tyr-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly</i> -)         |                                |
| (19) цикло (- <i>L-Leu-L-Tyr-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly</i> -) |                                |
| (20) цикло (- <i>L-Leu-L-Tyr-Arn-Arn</i> -)                         |                                |
| (21) цикло (- <i>L-Leu-L-Tyr-Ahx-Ahx</i> -)                         |                                |

\* Предыдущие сообщения см. [1, 2].

\*\* Для обозначения аминокислотных остатков и их производных используются сокращения, рекомендованные IUPAC [3]; *Arn* –  $H_2N(CH_2)_4COOH$ , *Ahx* –  $H_2N(CH_2)_5COOH$ , *Woc* – трет-бутилоксикарбонил-, *ONSu* – оксисукцинимидо- и ДМФА – диметилформамид, ДЦГК – *N,N'*-дидициклогексилкарбодимид.

## Физико-химические характеристики линейных пептидов

Соединение	Т. пл., °С	Растворитель для перекристаллизации	$[\alpha]_D$ град.	Концентрация, %	Растворитель	$R_f$	Носитель	Система*
(1)	183—184	Этилацетат — диоксан	-38,3	1,8	Этанол	0,50	E	IIIб
(2)	218—220	Этилацетат — диоксан	-10,2	3,0	»	0,40	E	IIIб
(3)	219—220	Этилацетат — диоксан	9,5	1,6	»	0,40	E	IIIб
(4)	184—185	Этилацетат — диоксан	38,0	0,8	»	0,50	E	IIIб
(5)	228—230	Ацетон — диоксан	-20,6	1,5	»	0,55	E	IIIб
(6)	225—229	Ацетон — диоксан	87,2	1,7	»	0,35	E	IIIб
(7)	225—229	Ацетон — диоксан	-86,8	1,4	»	0,35	E	IIIб
(8)	229—231	Ацетон — диоксан	20,1	1,4	»	0,55	E	IIIб
(9)	168,5—169	Бензол — динизопропиловый эфир	-24,0	1,8	»	0,45	E	Ia
(10)	142,5—143	Бензол — этилацетат	-40,3	1,5	»	0,40	E	Ia
(11)	143—144	Бензол — этилацетат	39,5	1,6	»	0,40	E	Ia
(12)	168—169	Бензол — динизопропиловый эфир	23,3	1,2	»	0,45	E	Ia
(13)	168—168,5	Этилацетат	-10,0	1,2	»	0,48	E	Ia
(14)	133—134	Бензол — этилацетат	25,4	1,6	»	0,40	E	Ia
(15)	133—134	Бензол — этилацетат	-25,2	1,5	»	0,40	E	Ia
(16)	168—168,5	Этилацетат	9,5	1,8	»	0,48	E	Ia
(31)	107,5—108,5	Бензол — гексан	7,2	2,0	»	0,50	A	Iв
(32)	199—200	Этанол	-22,0	1,8	»	0,60	E	IIa
(34)	184—185	Этилацетат	-23,2	0,5	»	0,40	E	Ia
(37)	211—212	Диоксан — этилацетат	-37,6	0,3	»	0,70	E	IIб
(38)	Аморфный	—	-53,5	0,4	»	0,40	E	IVa
(40)	136—137	Этилацетат	—	—	—	0,70	E	V
(41)	151—152	—	—	—	—	—	—	—
(42)	141—143	Этилацетат — диоксан	-22,8	0,3	ДМФА	0,30	A	IIIв
(43)	Аморфный	—	2,7	1,6	»	0,40	E	IIв
(44)	»	—	-7,8	0,9	»	0,55	E	IVa
(46)	150—151	Этанол	—	—	»	0,50	S	V
(47)	192—194	Изопропанол	-3,0	1,5	ДМФА	0,40	A	V
(48)	Аморфный	—	30,7	0,2	Вода	0,50	E	IVб
(49)	»	—	-5,1	0,9	ДМФА	0,60	E	IVб
(50)	»	—	-26,6	1,3	»	0,35	S	V
(51)	»	—	-25,2	0,2	ДМФА — вода (1:1)	0,45	S	V
(52)	»	—	-20,9	0,4	То же	0,60	E	IVб
(53)	»	—	-17,8	0,6	»	0,75	E	V
(58)	143,5—144,5	Метанол — ацетон — эфир	—	—	—	0,70	S	V
(59)	121—122	Метанол — эфир	—	—	—	0,75	S	V
(60)	145—145,5	Бензол — этилацетат	-30,3	0,5	Этанол	0,55	E	Iб
(61)	119—120	Этилацетат — эфир — петролейный эфир	-19,6	0,5	»	0,80	E	Iб
(62)	Аморфный	—	23,9	0,7	»	0,75	E	IVa
(63)	»	—	33,6	0,5	»	0,75	S	V
(64)	48,5—50	Эфир — петролейный эфир	—	—	—	0,20	E	Iв
(65)	73—75	Эфир — петролейный эфир	—	—	—	0,35	E	Iв
(66)	176,5—178	Этилацетат — спирт	-29,2	0,4	Этанол	0,40	E	Ia
(67)	139—141	Этилацетат — петролейный эфир	-33,2	0,6	»	0,65	E	Iв
(68)	99—101	Этилацетат — петролейный эфир	-10,3	0,5	»	0,70	E	IVб
(69)	127—129	Эфир — петролейный эфир	-21,0	0,6	»	0,40	E	IVa

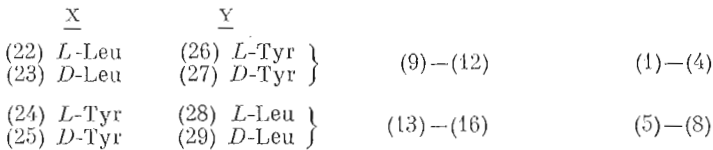
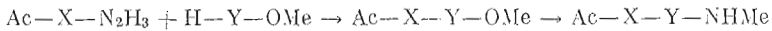
Таблица 1 (продолжение)

Соединение	Т. пл., °С	Растворитель для перекристаллизации	$[\alpha]_D$ град.	Концентрация, %	Растворитель	$R_f$	Носитель	Система*
(70)	158—160	Этилацетат — эфир — петролейный эфир	-29,0	0,3	»	0,70	Е	Ia
(71)	206,5—208	Эфир — петролейный эфир	-5,1	0,5	»	0,30	Е	Ib
(72)	Аморфный	—	-23,6	1,3	»	0,45	Е	IVa
(73)	»	—	-3,5	0,8	»	0,65	Е	IVa

\* Носители —  $Al_2O_3$ , пластинки с закрепленным слоем силикагеля «Silufol» и «Eastman» обозначены как А, S и E соответственно. Системы, состоящие из этилацетата и этилацетата с бензолом в соотношении 2 : 1 и 1 : 1, обозначены Ia, Ib и Iв соответственно; системы из этилацетата и диоксана (3 : 1, 2 : 1 и 1 : 2) — IIa, IIб и IIв; системы из этилацетата с этанолом (19 : 1, 9 : 1 и 3 : 1) — IIIa, IIIб и IIIв; смесь диоксан — вода (19 : 1 и 9 : 1) — IVa и IVб; четырехкомпонентная система *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (4 : 1 : 1 : 2) обозначена как V.

В данной статье описан синтез перечисленных соединений. Защищенные дипептиды (1) — (16) получены по схеме 1, их физико-химические

Схема 1



константы приведены в табл. 1. Оптическая чистота соединений (1) — (16) подтвердилась при исследовании их ИК-спектров и спектров ЯМР, которые будут рассмотрены в одном из наших последующих сообщений.

Схема 2

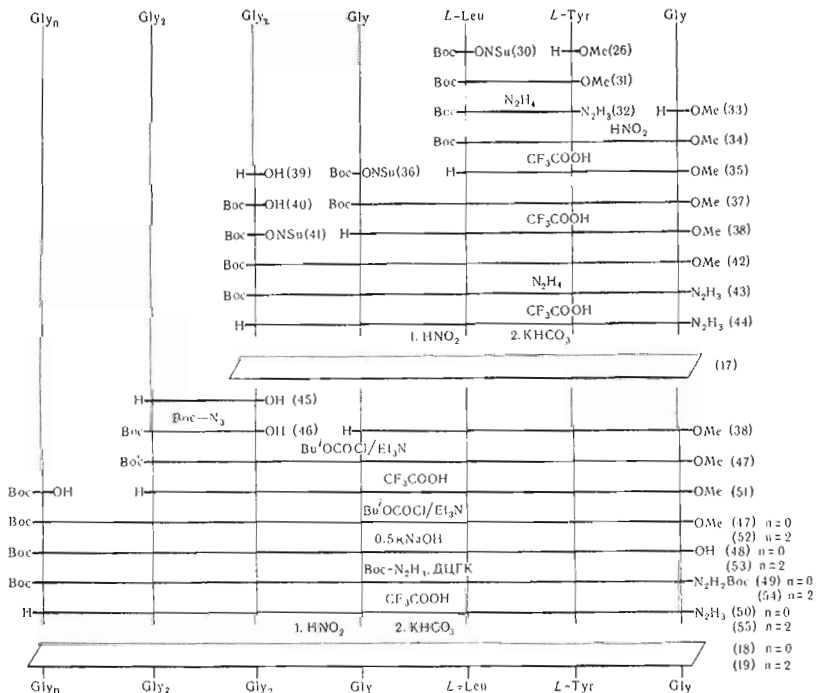
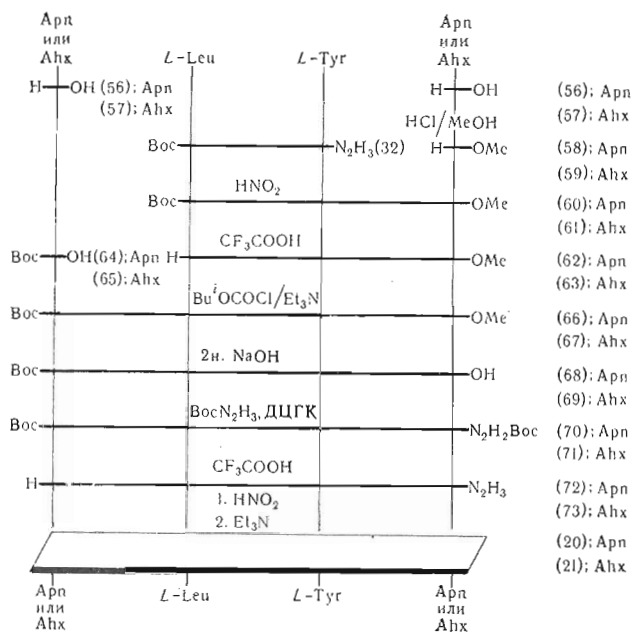


Схема 3



Циклопептиды (17)–(21) получены обычными методами пептидного синтеза по схемам 2 и 3. Циклизацию во всех случаях проводили азидным методом в воде или диметилформамиде в условиях высокого разбавления; при этом не возникало опасности ацилирования тирозиновой оксигруппы, которую следует учитывать при использовании других методов циклизации (например, метода *p*-нитрофениловых эфиров [4]). Необходимый для синтеза азид гидразид (43) получали прямым гидразиномлизом эфира (42), однако у более длинных пептидов (47) и (52) взаимодействие с гидразином протекало медленно и не до конца. Более удобным оказалось их омыление с последующей конденсацией образовавшихся кислот (48) и (53) с *tert*-бутилоксикарбонилгидразином и удалением Boc-групп действием трифторуксусной кислоты. Аналогичный прием был использован при получении гидразидов (70) и (71). Строение и индивидуальность циклопептидов (17)–(21) доказывали данными аминокислотного и элементного анализов, спектров ЯМР, ИК-, УФ-спектров, а также масс-спектрометрическим определением молекулярного веса (табл. 2).

### Экспериментальная часть

Индивидуальность всех соединений контролировали ТСХ на окиси алюминия и силикагеле. Температуры плавления не исправлены. Удельное вращение измеряли на спектрополяриметре «Perkin-Elmer» 141m при 23–25°.

*Метилловые эфиры ацетилдипептидов (9)–(16).* К раствору 10 ммоль гидразида (22)–(24) или (25) [5, 6] в смеси 34 мл воды, 3,4 мл ледяной CH<sub>3</sub>COOH и 2,5 мл конц. HCl при перемешивании и охлаждении до 0° прибавляли раствор 0,69 г (10 ммоль) NaNO<sub>2</sub> в 10 мл воды (~4°). Реакционную массу перемешивали 10 мин, экстрагировали этилацетатом (3X × 100 мл), объединенные вытяжки промывали холодным насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и водой, быстро высушивали MgSO<sub>4</sub> при 0°. Полученный этилацетатный раствор азид прибавляли к метиловому эфиру (26)–(28) или (29), приготовленному в 15 мл ДМФА из 8 ммоль соответствующего хлоридрата и 1,3 мл триэтиламина. Реакционную смесь выдержи-

вали 48 ч при 0–5°, осадок хлоридрата триэтиламина отфильтровывали, фильтрат промывали 2л. HCl, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, высушивали MgSO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с кремневой кислотой в системе бензол – хлороформ – диоксан (градиентное элюирование) и перекристаллизовывали из этилацетата или смеси этилацетата с бензолом или диизопропиловым эфиром, получая дипептиды (9)–(16) с выходом 40–60%.

*N*-метиламиды ацеталдипептидов (I)–(8). Растворяли 3,5 г (10 ммоль) дипептида (9)–(15) или (16) в 5 мл жидкого метиламина и оставляли в запаянной ампуле на 24 ч при 20°. Остаток после удаления метиламина хроматографировали на колонке с кремневой кислотой (хлороформ – диоксан – этанол, градиентное элюирование) и перекристаллизовывали из диоксана или смеси диоксана с этилацетатом или ацетоном. Выход 70–85%.

*трет*-Бутилоксикарбонилглицилглицин (40). Перемешивали 24 ч при 45° 19,8 г (0,15 моль) глицилглицина (39) (фирма «Reanal», Венгрия) с 30 мл *трет*-бутилоксикарбонилзида и 18 г MgO в 300 мл смеси диоксан – вода (1:1), разбавляли водой, подкисляли лимонной кислотой до pH 4, промывали эфиром, водный слой многократно экстрагировали этилацетатом, объединенные вытяжки высушивали MgSO<sub>4</sub>, упаривали, остаток перекристаллизовывали из этилацетата. Выход 23,2 г (66,5%).

*трет*-Бутилоксикарбонилтриглицилглицин (46) получали в условиях предыдущего опыта, исходя из 12,3 г (0,05 моля) триглицилглицина (45) (фирма «Reanal», Венгрия). После окончания реакции смесь разбавляли водой, осадок отфильтровывали, фильтрат промывали эфиром и пропускали через колонку с дауэксом 50×4

Таблица 2

Физико-химические характеристики циклопептидов

Соединение	Т. пл., °С	Растворитель для перекристаллизации	[α] <sub>D</sub> град.	Концентрация, с	Растворитель	R <sub>f</sub>	Носитель	Система*	Данные УФ-спектров (этанол – вода 3 : 1)		M (масс-спектрометрически)	Частоты некоторых полос в ИК-спектрах (таблетки с KBr, см <sup>-1</sup> )			
									ε <sub>225</sub>	ε <sub>278</sub>		амид А	амид I	амид II	амид III
(17)	298–300 (разл.)	96%-ный этанол	–43,6	0,4	DMFA	0,60	A	IV 6	9400	1590	504	3420	1675	1540	1220
(18)	178–180	Метанол – этилацетат	–28,8	0,3	Этанол	0,50	E	Этанол IV 6	10 100	1590	618	3350	1660	1540	1240
(19)	196–198 (разл.)	Метанол – этилацетат	–25,6	0,2	Этанол – вода (3 : 1)	0,65	E	IV 6	10 800	1560	—	3300	1660	1540	1240
(20)	268–270	Изопропанол	5,0	0,5	Этанол	0,35	E	Диоксан Ia	9300	1660	474	3300	1635	1535	1250
(21)	167–169	Этилацетат – эфир – петролейный эфир	12,5	0,3	»	0,70	E	Ia	9700	1620	502	3310	1655	1520	1240

\* См. примечание к табл. 1.

(Н<sup>+</sup>-форма). Элюат упаривали в вакууме при 35°, остаток высушивали над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и перекристаллизовывали из этанола. Выход 14,7 г (85,4%).

*N*-оксисукцинимидный эфир трет-бутилоксикарбонилглицилглицина (41). К раствору 11,6 г (0,05 моль) кислоты (40) и 5,75 г (0,05 моль) *N*-оксисукцинимид в 200 мл абс. диоксиана добавляли при охлаждении 10,8 г (0,055 моль) ДЦГК, через 16 ч (20°) осадок *N,N'*-дициклогексимочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали и остаток перекристаллизовывали из изопропилового спирта. Выход 14,7 г (89,6%).

*Метилловый эфир трет-бутилоксикарбонил-L-лейцил-L-тирозина* (31). К суспензии 46,2 г (0,2 моль) хлоридрата метилового эфира *L*-тирозина (26) в 1500 мл хлороформа при охлаждении (-15°) прибавляли 30,8 мл (0,22 моль) триэтиламина, через 5 мин вносили 65,6 г (0,2 моль) *N*-оксисукцинимидного эфира трет-бутилоксикарбониллейцина (30) [7], перемешивали 16 ч при 20°, промывали 30%-ным раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, высушивали MgSO<sub>4</sub>, упаривали. Остаток кристаллизовали в смеси этилацетат — эфир — петролейный эфир и перекристаллизовывали из смеси бензол — гексан. Выход 58,2 г (71,3%).

*Гидразид трет-бутилоксикарбонил-L-лейцил-L-тирозина* (32). К горячему раствору 61,2 г (0,15 моль) защищенного дипептида (31) в 450 мл абс. спирта прибавляли 36,5 мл (0,75 моль) гидразингидрата, кипятили 5 ч, выдерживали 16 ч при 20°, упаривали досуха, остаток перекристаллизовывали из 150 мл абс. этанола. Выход 56,2 г (91%).

*Метилловый эфир трет-бутилоксикарбонил-L-лейцил-L-тирозилглицина* (34). К раствору 16,3 г (0,04 моля) гидразида (32) в 200 мл ДМФА при охлаждении до -5° прибавляли 40,6 мл 4 н. HCl, затем холодный раствор 2,96 г (0,043 моль) NaNO<sub>2</sub> в 10 мл воды. Раствор перемешивали 10 мин при -5°, нейтрализовали реакционную массу триэтиламином, быстро высушивали Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 0°, отфильтровывали осушитель и к полученному раствору прибавляли холодный раствор метилового эфира глицина (33), приготовленный в 200 мл ДМФА из 7,51 хлоридрата и 8,40 мл (по 0,06 моль) триэтиламина. Реакционную смесь выдерживали 72 ч при 0—4° и упаривали досуха. Остаток растворяли в этилацетате, промывали 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и водой, высушивали Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали в вакууме, остаток перекристаллизовывали из 150 мл этилацетата. Выход 15,2 г (82%).

*Трифторацетаты метиловых эфиров и гидразидов* (35), (38), (44), (50), (51), (55), (62), (63), (72) и (73). 10 ммоль трет-бутилоксикарбонильного производного (34), (37), (43), (47), (49), (54), (60), (61), (70) или (71) обрабатывали 10 мл трифторуксусной кислоты в течение 40 мин при 20°. Остаток после упаривания растирали под абс. эфиром [соединения (35), (38), (44), (50), (51), (55), (72) и (73)] или петролейным эфиром [трипептиды (62) и (63)]. Соединения (35), (38), (44), (50) и (51) переосаждали из метанола абс. эфиром, а соединения (62) и (63) — соответственно из этилацетата и эфира петролейным эфиром. Выходы трифторацетатов 80—95% (аморфные порошки).

*Метилловый эфир трет-бутилоксикарбонилглицил-L-лейцил-L-тирозилглицина* (37). К раствору 14,3 г (0,03 моль) аминоксира (35) в 200 мл абс. диоксиана при охлаждении (~10°) прибавляли 4,61 мл (0,033 моль) триэтиламина, через 5 мин вносили 8,15 г (0,03 моль) *N*-оксисукцинимидного эфира трет-бутилоксикарбонилглицина (36), перемешивали 16 ч (20°) и добавляли этилацетатом. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этилацетатом, получали 5,85 г защищенного тетрапептида (37). Фильтрат промывали 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и водой, высушивали MgSO<sub>4</sub>, упаривали, получали еще 7,15 г тетрапептида (37). Общий выход 13,0 г (83,5%).

*Метилловый эфир трет-бутилоксикарбонилтриглицил-L-лейцил-L-тирозилглицина* (42). Смесь 3,29 г (10 ммоль) *N*-оксисукцинимидного эфира

(41), 5,36 г (10 ммоль) трифторацетата тетрапептида (38), 1,58 мл (11 ммоль) триэтиламина и 120 мл ДМФА перемешивали при 20° в течение 16 ч и упаривали в вакууме досуха, остаток растирали под этилацетатом, промывали смесью этилацетата с эфиром и петролейным эфиром. После перекристаллизации из смеси этилацетата с диоксаном выход гексапептида 3,84 г (60,5%).

*Гидразид трет-бутилоксикарбонилтриглицил-L-лейцил-L-тирозилглицина (43)*. Раствор 3,50 г (5,5 ммоль) эфира (42) в 20 мл абс. спирта выдерживали с 0,29 мл (6 ммоль) гидразингидрата (24 ч, 20°) и упаривали досуха. После пересаживания остатка из этанола этилацетатом получали аморфный порошок. Выход 3,14 г (89,8%).

*Метилловый эфир трет-бутилоксикарбонилпентаглицил-L-лейцил-L-тирозилглицина (47)*. К раствору 5,19 г (15 ммоль) кислоты (46) в 60 мл ДМФА при -10° прибавляли 2,16 мл (15 ммоль) триэтиламина и 2,05 мл (15 ммоль) изобутилового эфира хлоругольной кислоты, перемешивали при этой температуре 10 мин и добавляли холодную смесь 8,05 г трифторацетата (38), 2,16 мл триэтиламина (по 15 ммоль) в 80 мл ДМФА. Перемешивали 48 ч при 20°, упаривали досуха, остаток промывали горячим этилацетатом и хлороформом, растирали под петролейным эфиром и перекристаллизовывали из изопропилового спирта. Выход 7,10 г (64,5%).

*Метилловый эфир трет-бутилоксикарбонилгептаглицил-L-лейцил-L-тирозилглицина (52)* получали в условиях предыдущего опыта (исключая перекристаллизацию исходя из 7,64 г трифторацетата октапептида (51) и 2,32 г кислоты (40) (по 10 ммоль). Выход 8,06 г (93,5%).

*трет-Бутилоксикарбонилпентаглицил-L-лейцил-L-тирозилглицин (48)*. Суспензию 3,0 г (4 ммоль) октапептида (47) в 16 мл 0,5 н. водного NaOH перемешивали 40 мин при 20°, полученный раствор разбавляли водой и пропускали через колонку с дауэксом 50×8 (H<sup>+</sup>-форма). Элюат упаривали в вакууме, после пересаживания остатка из метанола эфиром получали 2,40 г (81,7%) аморфного порошка.

*трет-Бутилоксикарбонилгептаглицил-L-лейцил-L-тирозилглицин (53)* получали аналогично (48) из 7,77 г (9 ммоль) декапептида (52) с тем отличием, что перед пропуском через катионит смесь нейтрализовали 1 н. HCl. Выход 5,46 г (73%).

*трет-Бутилоксикарбонилгидразид трет-бутилоксикарбонилпентаглицил-L-лейцил-L-тирозилглицина (49)*. К раствору 3,31 г (4,5 ммоль) кислоты (48) в 75 мл ДМФА прибавляли при -5° 0,65 г трет-бутилоксикарбонилгидразина и 0,92 г ДЦГК (по 4,5 ммоль), перемешивали 48 ч (20°), осадок N,N'-дициклогексилмочевины отделяли центрифугированием, фильтрат упаривали досуха, аморфный остаток промывали этилацетатом, хлороформом, петролейным эфиром и высушивали в вакууме. Выход 2,72 г (72,5%).

*трет-Бутилоксикарбонилгидразид трет-бутилоксикарбонилгептаглицил-L-лейцил-L-тирозилглицина (54)* получали аналогично защищенному октапептиду (49) с тем отличием, что 5,10 г (6 ммоль) исходной кислоты (53) вводили в реакцию в виде суспензии в 100 мл ДМФА, а полученный сырой продукт (4,15 г, 72%) использовали далее без дополнительной очистки.

*Хлоргидраты метиловых эфиров δ-аминовалериановой и ε-аминокапроновой кислот (58) и (59)*. Раствор 0,05 моль хлоргидрата аминокислоты (56) или (57) в 75 мл метанола насыщали сухим HCl (0°), выдерживали 48 ч при 20°, упаривали досуха и повторяли насыщение еще раз. После упаривания и двукратного пересаживания остатка из смеси метанол-ацетон — эфир или метанол — эфир выход соответствующих эфиров составлял 60–65%.

*трет-Бутилоксикарбонил-δ-аминовалериановая- и трет-бутилоксикарбонил-ε-аминокапроновая кислоты (64) и (65)*. Перемешивали 0,05 моль аминокислот (56) или (57) с 6,0 г (0,15 моль) MgO и 9,5 мл (0,06

ммоль) *трет*-бутилоксикарбонилзида (24 ч, 45°). Смесь подкисляли лимонной кислотой, экстрагировали эфиром, из эфирных вытяжек продукт извлекали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водную фазу подкисляли и экстрагировали эфиром, органический слой высушивали  $\text{MgSO}_4$ , упаривали, остаток перекристаллизовывали из смеси эфира с петролейным эфиром. Выход 70–75%.

*Метилловые эфиры трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лейцил-*L*-тирозил- $\delta$ -аминовалериановой и *трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лейцил-*L*-тирозил- $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты (60) и (61) получали из 12,3 г (0,03 моль) гидразида (32) и метиловых эфиров (58) или (59) в условиях синтеза защищенного трипептида (34). Выход (60) 78,3%, а в случае (61) получающееся после обработки маслом высаживали из метанола водой, образовавшийся осадок переосаждали из смеси этилацетат — эфир — петролейный эфир. Выход 74%.

*Метилловые эфиры трет*-бутилоксикарбонил- $\delta$ -аминовалериол-*L*-лейцил-*L*-тирозил- $\delta$ -аминовалериановой и *трет*-бутилоксикарбонил- $\epsilon$ -аминокапроил-*L*-лейцил-*L*-тирозил- $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты (66) и (67). 18 ммоль кислоты (64) или (65) вводили в реакцию с эквивалентным количеством трифторацетата трипептида (62) или (63) в условиях получения октапептида (47). Реакционную массу упаривали, остаток растворяли в хлороформе, промывали 1 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  и водой, высушивали и упаривали. Остаток тетрапептида (66) перекристаллизовывали из смеси 150 мл этилацетата и 20 мл этанола, выход 8,50 г (78%), а (67) — из смеси петролейный эфир — этилацетат, выход 6,50 г (69,5%).

*трет*-Бутилоксикарбонил- $\delta$ -аминовалериол-*L*-лейцил-*L*-тирозил- $\delta$ -аминовалериановая и *трет*-бутилоксикарбонил- $\epsilon$ -аминокапроил-*L*-лейцил-*L*-тирозил- $\epsilon$ -аминокапроновая кислоты (68) и (69). К раствору 10 ммоль защищенного пептида (66) или (67) в 15 мл метилового спирта прибавляли 18 мл 2 н.  $\text{NaOH}$  (36 ммоль), перемешивали 1 ч при 20°, разбавляли водой, промывали этилацетатом, водную фазу подкисляли до pH 3 и экстрагировали этилацетатом. Объединенные вытяжки высушивали  $\text{MgSO}_4$ , упаривали, остаток переосаждали из этилацетата или эфира петролейным эфиром. Выход 90%.

*трет*-Бутилоксикарбонилгидразиды *трет*-бутилоксикарбонил- $\delta$ -аминовалериол-*L*-лейцил-*L*-тирозил- $\delta$ -аминовалериановой и *трет*-бутилоксикарбонил- $\epsilon$ -аминокапроил-*L*-лейцил-*L*-тирозил- $\epsilon$ -аминокапроновой кислот (70) и (71) получали в дноксапе из 2,96 г (5 ммоль) кислоты (68) или 3,10 г (5 ммоль) кислоты (69) аналогично гидразиду октапептида (49). После отделения  $\text{N,N}'$ -дициклогексилмочевины фильтр упаривали и остаток хроматографировали на силикагеле в системе бензол — этилацетат (градиентное элюирование). Выход 60–67%.

*Цикло*(-тетраглицил-*L*-лейцил-*L*-тирозил-) (17) и *цикло*(-гексаглицил-*L*-лейцил-*L*-тирозил-) (18). Растворяли 2 ммоль дитрифторацетата (44) или (50) в 20 мл 0,5 н.  $\text{HCl}$ , при охлаждении ( $\sim 0^\circ$ ) прибавляли холодный водный раствор 0,21 г (3 ммоль)  $\text{NaNO}_2$ , смесь перемешивали при этой температуре 10 мин, выливали в холодный раствор 7,5 г  $\text{KHCO}_3$  в 2000 мл воды. Выдерживали 120 ч при 0–4° и 24 ч при 20°, подкисляли до нейтральной реакции и упаривали досуха. Из остатка продукт экстрагировали горячим этанолом, спиртовый раствор пропускали через 50 г нейтральной  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (III ст. акт) и упаривали. Остаток растворяли в смеси метанол — вода и фильтровали через смолы дауэкс 50×8 ( $\text{H}^+$ -форма) и дауэкс 1×4 ( $\text{HCO}_3^-$ -форма). Перекристаллизацией из водного спирта получали циклопептид (17), выход 0,41 г (42%), а перекристаллизацией из смеси метанола с этилацетатом — циклопептид (18), выход 0,58 г (46%).

*Цикло*(-октаглицил-*L*-лейцил-*L*-тирозил-) (19) получали аналогично (17) и (18) с тем отличием, что 2,5 г исходного сырого дитрифторацетата (55) суспендировали в 100 мл 1 н.  $\text{HCl}$ , а реакционную массу после обработки 0,31 г  $\text{NaNO}_2$  выливали в 2500 мл воды, содержащей 25 г  $\text{KHCO}_3$ .



После пропуска через ионообменники продукт хроматографировали на 30 г нейтральной  $Al_2O_3$  (III ст. акт.) в системе этилацетат — этанол (градиентное элюирование), вымываемую спиртом фракцию хроматографировали затем на 30 г силикагеля. Смесью диоксан — 96%-ый этанол (1:1) вымывали циклопептид (19). После перекристаллизации из метанола с этилацетатом выход циклодекапептида (19) составлял 0,27 г (14,6%).

Цикло[-(ди- $\delta$ -аминовалероил)-L-лейцил-L-тирозил-] (20) и цикло[-(ди- $\epsilon$ -аминокапроил)-L-лейцил-L-тирозил-] (21). К раствору 1,84 г (2,5 ммоль) дитрифторацетата (72) или 1,91 г (2,5 ммоль) дитрифторацетата (73) в 15 мл ДМФА при перемешивании и охлаждении до  $-5^\circ$  прибавляли 2,5 мл 4 н. HCl и холодный раствор 0,189 г (2,75 ммоль)  $NaNO_2$  в 1 мл воды, перемешивали 10 мин ( $-5^\circ$ ) и выливали в 1300 мл ДМФА, содержащего 2,5 мл триэтиламина. Выдерживали 96 ч ( $0-4^\circ$ ), упаривали досуха, остаток растворяли в метаноле и пропускали через смолы дауэкс  $50 \times 8$  ( $H^+$ -форма) и дауэкс  $1 \times 4$  ( $HCO_3^-$ -форма). Элюат упаривали и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в системе бензол — этилацетат — диоксан (градиентное элюирование), получая после перекристаллизации из смеси диоксана с изопропиловым спиртом 0,54 г (40%) циклотетрапептида (20). В случае циклопептида (21) хроматографировали в системе бензол — этилацетат и перекристаллизовывали из смеси этилацетат — эфир — петролейный эфир. Выход 0,52 г (41,7%).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Казанская Н. Ф., Слободянская Е. М., Цетлин В. И., Шепель Е. Н., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1970) Биохимия 35, 1147—1151.
2. Tsetlin V. I., Portnova S. L., Balashova T. A., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1973) in «Peptides 1972» p. 384—391. North — Holland Publishing Company, Amsterdam.
3. IUPAC — IUB Commission on biochemical nomenclature, Biochem. J. (1972) 126, 773—780.
4. Ramachandran J., Li C. H. (1963) J. Org. Chem. 28, 173—177.
5. Lutwack R., Mower H. F., Niemann C. (1957) J. Amer. Chem. Soc. 79, 2179—2184.
6. Smart N. A., Yong G. T., Williams M. W. (1960) J. Chem. Soc. 3902—3912.
7. Anderson G. W., Zimmerman I. E., Callahan F. M. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 1839—1842.

Поступила в редакцию  
26.IX.1974

#### CONFORMATIONAL ASPECTS OF THE INTERACTION OF PEPTIDES WITH PROTEOLYTIC ENZYMES. SYNTHESIS OF THE LINEAR AND CYCLIC PEPTIDES CONTAINING LEUCYLTYROSYL AND TYROSYLLEUCYL FRAGMENTS

TSETLIN V. I., SHEPEL E. N., IVANOV V. T., OVCHINNIKOV Yu. A.

*M. M. Shenyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

To investigate the role of conformational factors in the interaction of peptides with proteolytic enzymes, the following substrates or inhibitors have been synthesized: LL, LD, DL and DD stereoisomers of Ac-Leu-Tyr-X, Ac-Tyr-Leu-X ( $X=OMe$  or  $NHMe$ ), and also a series of cyclopeptides cyclo(-L-Leu-L-Tyr-Gly $_n$ -) ( $n=4, 6$  or  $8$ ), cyclo(-L-Leu-L-Tyr-Apn-Apn-) and cyclo(-L-Leu-L-Tyr-Ahx-Ahx-), where Apn and Ahx are the  $\delta$ -aminovaleric and  $\epsilon$ -aminocaproic acid residues respectively.