



УДК 547.962.07+542.95

СИНТЕЗ ДЕВЯТИЧЛЕННОГО ПЕПТИДНОГО ИНГИБИТОРА
ПЕПТИДИЛДИПЕПТИДАЗЫ*Филатова М. П., Брит Н. А., Ковальчук О. В.,
Комарова О. М.**Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва**Рейссманн З.**Университет им. Ф. Шиллера, Иена, ГДР*

Осуществлен синтез девятичленного пептидного ингибитора пептидилдипептидазы тремя различными способами. Показано, что оптимальным является путь, включающий первоначальный синтез С-концевого октапептида конденсацией тетрапептидных фрагментов и присоединение пироглутаминовой кислоты на последней стадии. Обнаружено, что в определенных условиях при конденсации пептидов, содержащих на N-конце пироглутаминовую кислоту, происходит раскрытие лактамного кольца с образованием глутаминовой кислоты.

Одним из перспективных направлений при создании антигипертензивных препаратов является поиск эффективных и специфических ингибиторов пептидилдипептидазы (КФ 3.4.15.1). Ингибирование этого фермента в организме препятствует превращению неактивного ангиотензина I в ангиотензин II, повышающий кровяное давление, и предотвращает инактивацию брадикинина, являющегося мощным гипотензивным агентом. Таким образом, суммарный эффект действия ингибиторов пептидилдипептидазы может быть использован для нормализации патологически повышенного кровяного давления.

В 1971 г. Ондетти в поисках ингибиторов пептидилдипептидазы выделил ряд брадикининпотенцирующих пептидов из яда *Bothrops jararaca* I и установил их аминокислотную последовательность. Наиболее активным и специфическим среди этих соединений оказался нонапептид SQ 20881 — Pyl-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro (1).

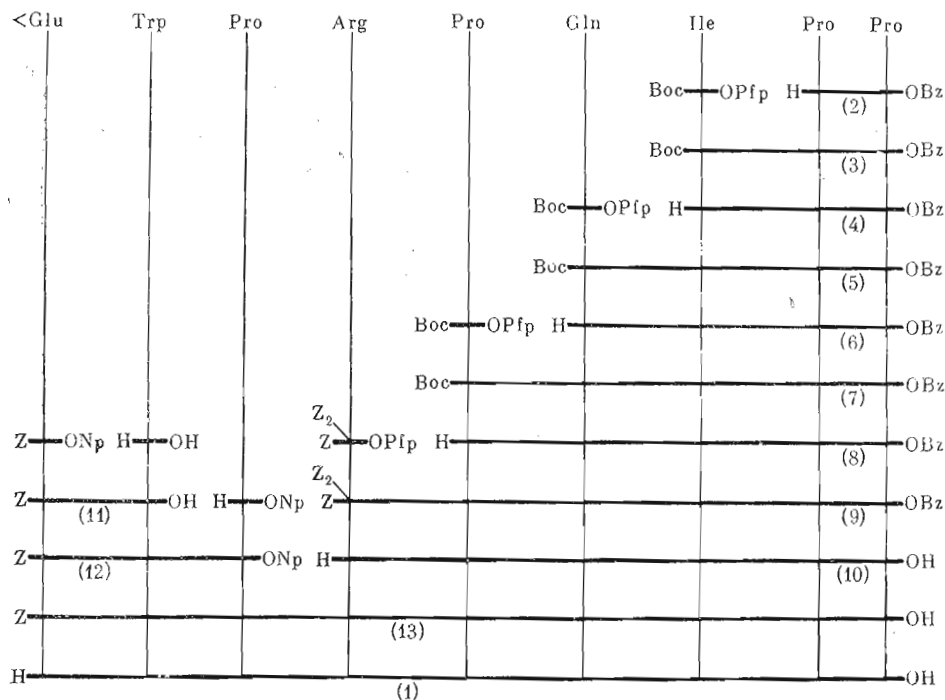
В настоящее время стоит вопрос о возможности применения нонапептида (1) не только в биохимических исследованиях, но и в медицинской практике, в связи с чем большое значение приобретает разработка оптимального метода синтеза этого соединения.

Нонапептидный ингибитор пептидилдипептидазы (1) был впервые синтезирован Ондетти и сотр. [1, 2] твердофазным методом. Ими же позднее [3] был осуществлен классический синтез этого соединения. Однако при описании последнего не были приведены детальные методики, выходы про-

Использованные сокращения: -ONp — *n*-нитрофенокси-, -OPfр — пентафторфенокси-, -OTср — 2,4,5-трихлорфенокси-.

межточных и конечных продуктов и их характеристики, что затрудняло оценку эффективности предложенного метода. В то же время, по нашим данным, использование схемы, предложенной этими авторами, приводит к низким выходам на стадии присоединения остатка глутамина; кроме того, известно, что значительные осложнения могут возникнуть при каталитическом гидрировании нитрогруппы аргинина [4, 5] и бензилоксикарбонильной группы триптофана [6–8] вследствие неоднозначности протекания реакций.

С х е м а 1



В связи с этим нами был предпринят новый синтез нонапептидного ингибитора пептиддипептидазы с учетом приведенных выше данных. Синтез нонапептида (1) проводили по схеме 1. С-Концевой гексапептид был получен исходя из бензилового эфира пролилпролина последовательным присоединением пентафторфениловых эфиров *трет*-бутилоксикарбониламинокислот. Остаток аргинина присоединяли в виде трибензилоксикарбонилпроизводного, учитывая легкость удаления этих групп гидрированием. Выходы на каждой стадии конденсации были на 10–20% выше по сравнению с аналогичным синтезом с использованием N-оксисукцинимидных или *n*-нитрофениловых эфиров. Наиболее значительное преимущество обнаружилось на стадии присоединения *трет*-бутилоксикарбонил-глутамина; в этом случае выход возрос на 40%. Удаление защитных групп с гексапептида проводилось без осложнений каталитическим гидрированием над Pd-чернью.

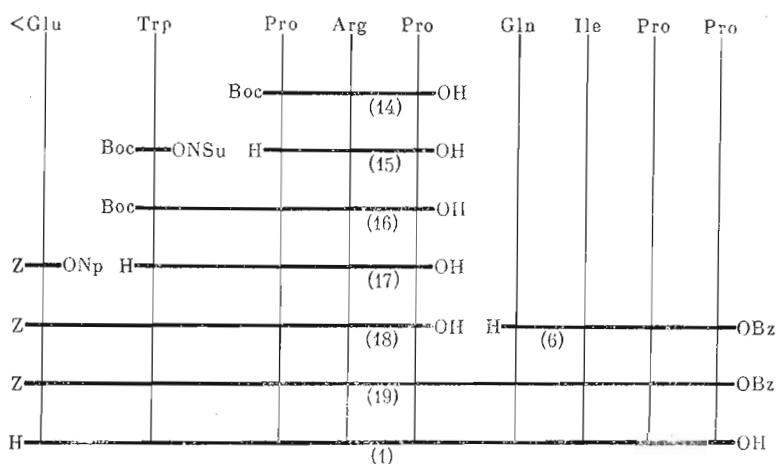
В настоящее время известно, что применение наиболее употребительных защитных групп — *трет*-бутилоксикарбонильной и бензилоксикарбонильной — в случае триптофана связано с опасностью модификации индольного кольца этой аминокислоты при их удалении [6–9]. В связи с этим для синтеза N-концевого трипептида была использована схема, согласно которой триптофан вводился в виде свободной аминокислоты конденсацией его триэтиламмониевой соли с *n*-нитрофениловым эфиром бензилоксикарбонилпироглутаминовой кислоты в пиридине и последующим

присоединением к полученному дипептиду (11) *n*-нитрофенилового эфира пролина методом смешанных ангидридов. При использовании на последней стадии карбодимидного метода образовалась смесь окрашенных продуктов, которые не удалось идентифицировать.

Соединение три- (12) и гексапептидного (10) фрагментов осуществлялось методом *n*-нитрофениловых эфиров и независимо от наличия 1-оксибензтриазола проходило с хорошим выходом. В этой конденсации гуанидиногруппа аргинина гексапептида (10) защищалась путем образования соли с карбоксилем С-концевого пролина. Результаты конформационного расчета структуры всего нонапептида (1), включающего гексапептид как С-концевой фрагмент [10], свидетельствуют в пользу внутримолекулярного механизма солеобразования, хотя никаких экспериментальных исследований структуры, подтверждающих эти данные, проведено не было. Хроматографическое и электрофоретическое исследование продукта реакции показало отсутствие побочного продукта, связанного с ацилированием гуанидинной группы аргинина, что свидетельствует об эффективности этого метода защиты. Этот факт в совокупности с ранее полученными данными свидетельствует об универсальности применяемого способа блокирования гуанидинной группы, который был с успехом использован при конденсации пептидов, содержащих остаток аргинина в различных положениях цепи: при расположении аргинина на С-конце молекулы [11, 12], удалении от него на один [13] или, как это имеет место в последнем случае, на пять аминокислотных остатков.

Однако при гидрировании защищенного нонапептида (13), полученного по схеме 1, было обнаружено, что восстановленный продукт содержит кроме основного пироглутамилпептида примесь нингидринположительного вещества. Выход этого побочного продукта заметно возрастал при увеличении (со 100 до ~500 мг) количеств вводимых в реакцию три- (12) и гексапептида (10). Очистка защищенного нонапептида (13) проводилась на силикагеле или сефадексе LH-20, причем при увеличении количества примеси, содержащейся в основном продукте, выход последнего после очистки заметно снижался.

С х е м а 2



Возникшие осложнения побудили нас к поиску других путей синтеза. В качестве альтернативного пути была выбрана схема 2. По этому варианту С-концевой тетрапептид (6) был получен, как и в предыдущем случае, хорошо зарекомендовавшим себя методом пентафторфениловых эфиров. Синтез N-концевого пентапептида проводили исходя из свободного дипептида аргинилпролина, в котором гуанидинная группа защищалась путем образования внутренней соли с карбоксилем пролина. Присоедине-

ние остатков пролина, триптофана и пироглутаминовой кислоты осуществлялось методом *n*-нитрофениловых и *N*-оксисулцинимидных эфиров, так как наши исследования показали, что при использовании для защиты гуанидинной группы метода внутреннего солсобразования именно эти эфиры являются наилучшими ацилирующими агентами.

Первоначально для защиты триптофана предполагалось использовать бензилоксикарбонильную группу, однако гидролиз бензилоксикарбонил-триптофил-пролил-аргинил-пролина в отдельных опытах проходил очень медленно и неоднозначно, по-видимому, вследствие насыщения гетероциклического ядра триптофана. Поэтому в дальнейшем мы использовали в качестве защитной группы *трет*-бутилоксикарбонильную группу. Отщелчение этой группировки проводилось действием раствора хлористого водорода в уксусной кислоте в присутствии анизола, поскольку, по данным Кишфалуди [14], применение такого реагента связано с наименьшей опасностью ацилирования ядра триптофана. Масс-спектрометрическое исследование продуктов реакции показало, что в данном случае при снятии *трет*-бутилоксикарбонильной группы *трет*-бутилирование индольного кольца не наблюдается.

Для конденсации пента- и тетрапептидных фрагментов (схема 2) были опробованы два метода: карбодиимидный в присутствии 1-оксибензотриазола и конденсация с *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолином. При использовании карбодиимидного метода продукт реакции после деблокирования содержал большое количество нингидринположительного вещества, хроматографически и электрофоретически идентичного соединению, полученному при синтезе нонапептида по схеме 1. Чистый нонапептид (19) был получен с выходом 30—40% после очистки продукта реакции на силикагеле.

При проведении конденсации с помощью *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина образование этого побочного продукта было, как правило, незначительным и лишь в отдельных опытах его количество достигало 15%.

Исследование побочного нингидринположительного продукта реакции дансильным методом показало, что он содержит на *N*-конце глутаминовую кислоту, которая образуется, по-видимому, при раскрытии цикла пироглутаминовой кислоты; аминокислотный анализ этого соединения соответствовал аминокислотному анализу соединения (1)*.

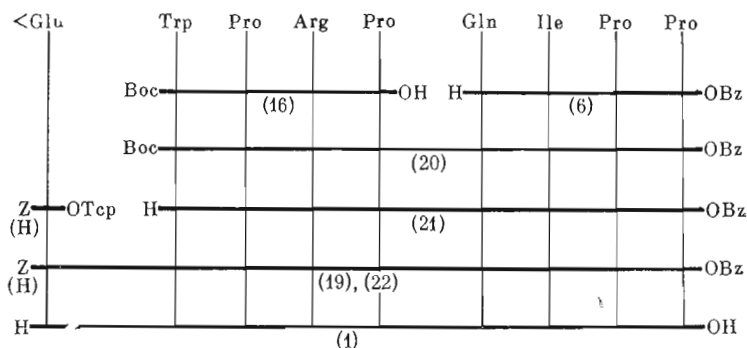
Из литературных данных известно, что раскрытие цикла пироглутаминовой кислоты может происходить в очень мягких условиях основного катализа, причем роль катализатора может играть остаток основной аминокислоты, например гистидина [15]. В нашем случае можно было допустить раскрытие цикла под влиянием гуанидинной группы аргинина вследствие неполного подавления ее основности протонированием. Однако выдерживание защищенного нонапептида (13) и *N*-концевого пентапептида (18) в метаноле или диметилформамиде в течение 7 сут не приводило к образованию нингидринположительного вещества после гидрирования. По-видимому, при получении нонапептида раскрытие лактамного кольца происходит во время конденсации фрагментов, один из которых имеет на *N*-конце пироглутаминовую кислоту, причем степень прохождения побочного процесса в наибольшей степени зависит от характера конденсирующего агента. Так, побочное образование глутаминовой кислоты в значительной степени наблюдается при использовании для конденсации *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида, *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида с 1-оксибензотриазолом и *n*-нитрофениловых эфиров и практически не происходит при применении *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина. Однако нельзя полностью исключить и влияние аминокислотного состава фрагмен-

* Подробное доказательство структуры побочного продукта будет представлено в отдельном сообщении.

та, включающего N-концевую пироглутаминовую кислоту, и прежде всего присутствия в нем аргинина, так как при получении активированных эфиров самой пироглутаминовой кислоты с помощью N,N'-дициклогексилкарбодиимида раскрытия цикла не наблюдается.

Исходя из полученных данных, можно было предположить, что наилучшие результаты даст метод синтеза, в котором введение остатка пироглутаминовой кислоты будет осуществляться на последней стадии синтеза. Синтез нонапептида согласно такой схеме (схема 3) подтвердил это

С х е м а 3



предположение. Октапептид (20) был получен с хорошим выходом конденсацией с помощью N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина тетрапептидных фрагментов (16) и (6), синтезированных по разработанным ранее методикам. Присоединение N-концевой пироглутаминовой кислоты осуществлялось с помощью 2,4,5-трихлорфениловых эфиров бензилоксикарбонил- или свободной пироглутаминовой кислоты с хорошим выходом. Никакой примеси нингидринположительного продукта после гидрирования защищенного нонапептида обнаружено не было. Чистый нонапептид (1) был получен после очистки на LH-20 с высоким выходом.

При сравнении аналитических характеристик нонапептидов, полученных различными методами, было найдено, что все образцы после очистки имели одинаковые электрофоретическую и хроматографическую подвижности и аминокислотный состав. Величины углов вращения колебались в пределах ошибки измерения, что доказывало отсутствие заметной рацемизации при соединении больших фрагментов (пента- и тетрапептидов по схеме 2 и двух тетрапептидов по схеме 3), так как по схеме 1 активация карбоксила проводилась на уровне аминокислотных остатков, что, как известно, дает наименьшую опасность рацемизации.

Брадикининпотенцирующая активность всех образцов была одинакова и соответствовала активности образца фирмы «Serva».

Экспериментальная часть

Температуры плавления определены в открытом капилляре и приведены без исправления. Индивидуальность полученных соединений проверяли хроматографией на бумаге Whatman 3MM в системах пиридин — изоамиловый спирт — вода (35 : 35 : 30) и *n*-бутанол — вода — уксусная кислота (4 : 5 : 1) и электрофорезом на бумаге FN-17 в горизонтальном приборе при градиенте потенциала 24 В·см⁻¹ в 1 М ацетатном буфере (рН 2,4) и пиридин-ацетатном буфере (рН 5,5). Для колоночной хроматографии использовали силикагель Л 40—100 мкм (Chemapol, Чехословакия). Оптическое вращение определяли на поляриметре «Perkin-Elmer», модель 241 (США). Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных в запаянных ампулах 6 н. НСl при 110°С в течение 24 ч, выполняли на автоматическом анализаторе «Bioscal» BC201 (ФРГ).

Растворы веществ в органических растворителях высушивали над $MgSO_4$ и упаривали в вакууме при температуре не выше $40^\circ C$. Выходы и константы полученных соединений приведены в таблице. Данные элементного анализа по C, H и N синтезированных соединений соответствовали вычисленным.

1. Хлоргидрат бензилового эфира изолейцил-пролил-пролина (4).

а) К охлажденному до $0 - (-5^\circ)C$ раствору 1,32 г пентафторфенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонилизолейцина и 1,12 г хлоргидрата бензилового эфира пролилпролина [13] в 7 мл этилацетата приливали при перемешивании 0,93 мл триэтиламина. Раствор выдерживали 15 мин при $0^\circ C$ и 2,5 ч при $18^\circ C$, pH реакционной среды поддерживали не ниже 8. К реакционной смеси приливали 15–20-кратное количество этилацетата, промывали водой, 10% лимонной кислотой, водой, 8% $NaHCO_3$, водой, сушили и упаривали. Выход защищенного трипептида 1,62 г (95%) (ср. [13]).

б) К раствору 1,21 г бензилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-изолейцил-пролил-пролина в 1,2 мл абс. диоксана приливали 3,6 мл 6 н. HCl в диоксане, выдерживали 40 мин при $18^\circ C$, упаривали, остаток растирали с абсолютным эфиром и отфильтровывали 0,75 г (74%) хлоргидрата трипептида (4).

2. Бензиловый эфир *трет*-бутилоксикарбонилглутаминил-изолейцил-пролил-пролина (5). Смесь 0,65 г пентафторфенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонилглутаминила и 0,77 г хлоргидрата трипептида (4) растворяли в 2,5 мл диметилформамида, охлаждали до $0^\circ C$, приливали 0,66 мл триэтиламина, перемешивали 15 мин при охлаждении и оставляли на 18 ч при $18^\circ C$, поддерживая pH реакционной среды не ниже 8. К реакционному раствору добавляли 20-кратное количество этилацетата, промывали водой, 10% лимонной кислотой, водой, 8% $NaHCO_3$, водой, сушили, упаривали. Остаток переосаждали из эфира гексаном, отфильтровывали 0,92 г (90%) тетрапептида (5), который очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле.

3. Бензиловый эфир *трет*-бутилоксикарбонилпролил-глутаминил-изолейцил-пролил-пролина (7). Хлоргидрат тетрапептида (6) получали из защищенного тетрапептида (5), как описано в опыте 1(б). К охлажденному до $0^\circ C$ раствору 0,33 г хлоргидрата тетрапептида (6) и 0,24 г пентафторфенилового эфира *трет*-бутилоксикарбонилпролина в 1,5 мл диметилформамида приливали 0,08 мл триэтиламина, выдерживали 1 ч при $0^\circ C$ и 18 ч при $18^\circ C$. Реакционную смесь фильтровали, упаривали, растворяли в метаноле и пропускали через дауэкс 50×8 в H^+ -форме и дауэкс 1×10 в OH^- -форме. Растворитель отгоняли, соединение (7) переосаждали из эфира гексаном.

4. Бензиловый эфир трибензилоксикарбониларгинил-пролил-глутаминил-изолейцил-пролил-пролина (9). Из 0,56 г защищенного пентапептида (7) в условиях опыта 1б получали 0,49 г хлоргидрата пентапептида (8). Полученный хлоргидрат конденсировали с 0,49 г пентафторфенилового эфира трибензилоксикарбониларгинина, как описано в опыте 2. Полученный гексапептид (9) очищали хроматографией на силикагеле в градиенте растворителей хлороформ – (метанол – хлороформ) (3:97).

5. Бензилоксикарбонилпироглутамил-триптофан (11). Смесь 1,5 г *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилпироглутаминовой кислоты, 0,8 г триптофана и 0,54 мл триэтиламина в 5 мл 95% водного пиридина перемешивали 48 ч при $18^\circ C$. Раствор упаривали в вакууме, к остатку приливали 25 мл воды и 25 мл этилацетата, отделяли водный слой, дважды промывали этилацетатом и подкисляли лимонной кислотой до pH 3. Выдерживали 1–2 ч при $5^\circ C$, дипептид (11) отфильтровывали и перекристаллизовывали из этанола. *M*: найдено 448 (титрование 0,01 н. NaOH), вычислено 449.

6. *n*-Нитрофениловый эфир бензилоксикарбонилпироглутамил-триптофил-пролина (12). К охлажденному до $-5^\circ C$ раствору 0,17 г дипептида

Соединение	Брутто-формула	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$, град	Выход, %
(1) <Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro	$C_{53}H_{76}N_{14}O_{12}$	211-216	-165,2 (с 0,5; 0,2 М CH_3COOH) -164,0 (с 0,5; 0,2 М CH_3COOH) -169,3 (с 0,5; 0,2 М CH_3COOH) -167,5 (с 0,5; 0,2 М CH_3COOH)	80* 75,2* 77,3* 78,4*
(5) Boc-Gln-Ile-Pro-Pro-OBz	$C_{33}H_{48}N_5O_8$	60-62	-151,1 (с 1; MeOH)	70
(6) HCl-Gln-Ile-Pro-Pro-OBz	$C_{28}H_{42}N_5O_6Cl$	95-98	-106,1 (с 1; MeOH)	92
(7) Boc-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBz	$C_{38}H_{58}N_6O_9$	91-95	-454,9 (с 1; MeOH)	67
(8) HCl-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBz	$C_{33}H_{49}N_6O_7Cl$	66-68	-453,3 (с 1; MeOH)	97
(9) Z-Arg(Z)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBz	$C_{63}H_{78}N_{10}O_{14}$	79-85	-435,2 (с 0,6; MeOH)	70
(10) Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro	$C_{32}H_{54}N_{10}O_8$	98-103	-119,8 (с 0,8; MeOH)	98
(11) Z-Pyr-Trp	$C_{21}H_{23}N_3O_6$	210-211	+21,2 (с 1; ДМФА)	75
(13) <Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro	$C_{61}H_{82}N_{14}O_{14}$	183-184	-134,5 (с 1; MeOH)	48
(16) Boc-Trp-Pro-Arg-Pro	$C_{32}H_{46}N_8O_7$	180-182	-53,2 (с 0,5; ДМФА)	93
(17) Trp-Pro-Arg-Pro	$C_{27}H_{38}N_8O_5$	190-193	-60,3 (с 1; MeOH)	79
(18) Z-<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro	$C_{40}H_{59}N_9O_9$	179-190	-86,2 (с 1; MeOH)	65
(19) Z-<Glu-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBz	$C_{68}H_{99}N_{14}O_{14}Cl$	86-91	-134,7 (с 1; MeOH)	67,5**
(20) Boc-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBz	$C_{60}H_{86}H_{13}O_{12}Cl$	146-158	-142,0 (с 0,5; MeOH)	67
(21) HCl-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBz	$C_{53}H_{79}N_{13}O_{10}Cl_2$	180-200	-113,1 (с 1; MeOH)	99
(22) <Glu-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBz	$C_{60}H_{83}N_{14}O_{12}Cl$	88-91	-147,0 (с 1; MeOH)	60

* Получено из соединения (13). ** Получено из соединения (19), схема 2. *** Получено из соединения (19), схема 3. **** Получено из соединения (22).
 * Приведены константы и выход соединения, полученного по методу (6), опыт 12.

(11) и 0,053 мл триэтиламина в 2 мл пиридина при перемешивании приливали 0,056 мл изобутилового эфира хлоругольной кислоты; перемешивали 10 мин при температуре от -5 до -7°C , затем быстро прибавляли 0,12 г бромгидрата *n*-нитрофенилового эфира пролина и 0,053 мл триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 2 ч при 18°C , выливали на лед и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатный раствор промывали 1% HCl, водой, сушили MgSO_4 , упаривали в вакууме и остаток растирали с сухим эфиром. Отфильтровывали 0,17 г (67%) светло-желтого порошка. Выход соединения (12) определяли спектрофотометрически при 400 нм по содержанию *n*-нитрофенола в образце вещества, гидролизованном 0,01 н. NaOH. Полученное соединение содержит 97% трипептида (12).

7. *Бензилоксикарбонилпироглутамил-триптофил-пролил-аргинил-пролил-глутаминил-изолейцил-пролил-пролин (13)*. 0,3 г защищенного гексапептида (9) гидрировали 8 ч в 10 мл метанола над Pd-чернью. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали в вакууме, остаток переосаждали из метанола эфиром. Получали 0,17 г свободного гексапептида (10).

Раствор 0,16 г гексапептида (10) и 0,2 *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонилпироглутамил-триптофил-пролина (12) в 0,5 мл диметилформамида выдерживали 24 ч при 37°C , добавляли избыток этилацетата и отфильтровывали 0,28 г пептида, который очищали хроматографией на силикагеле в системе хлороформ — метанол (градиентное элюирование) или гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле с выходом 48 и 52% соответственно.

8. *трет-Бутилоксикарбонилтриптофил-пролил-аргинил-пролин (16)*. К раствору 1,34 г пролил-аргинил-пролина [13] в 10 мл воды приливали раствор 1,9 г *N*-оксисукцинимидного эфира *трет*-бутилоксикарбонил-триптофана в 10 мл диоксиана и реакционную смесь выдерживали 2 ч при 37°C . Растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в 2,5 мл диметилформамида и оставляли на 24 ч при 37°C . К реакционной смеси приливали 25–30 мл этилацетата и отфильтровывали тетрапептид (16).

9. *Триптофил-пролил-аргинил-пролин (17)*. К раствору 0,3 г защищенного тетрапептида (16) и 0,4 мл анизол в 1 мл уксусной кислоты приливали 2 мл 4 н. HCl в уксусной кислоте. Раствор выдерживали 30 мин при 16°C , упаривали, приливали сухой эфир и отфильтровывали 0,29 г (93%) хлоргидрата тетрапептида (17). Полученный хлоргидрат растворяли в 2 мл воды, экстрагировали этилацетатом и пропускали через колонку с 10 мл смолы IRA-410 в OH^- -форме. Элюат упаривали, остаток переосаждали из метанола эфиром и получали 0,2 г свободного тетрапептида (17).

10. *Бензилоксикарбонилпироглутамил-триптофил-пролил-аргинил-пролин (18)* получали аналогично соединению (16) (опыт 8) из 1,07 г свободного тетрапептида (17) и 0,96 г *n*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонил-пироглутаминовой кислоты. Защищенный пентапептид (18) очищали хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование, хлороформ — метанол).

11. *Хлоргидрат бензилового эфира трет-бутилоксикарбонилтриптофил-пролил-аргинил-пролил-глутаминил-изолейцил-пролин-пролина (20)*. К суспензии 0,3 г тетрапептида (16) и 0,33 г хлоргидрата тетрапептида (6) в 3,5 мл свежеперегнанного сухого хлороформа прибавляли при 10°C 0,13 г *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина. Реакционную смесь перемешивали 1 сут при 18 – 20°C , приливали избыток этилацетата и отфильтровывали 0,5 г защищенного октапептида (20), который очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле.

12. *Хлоргидрат бензилового эфира бензилоксикарбонилпироглутамил-триптофил-пролил-аргинил-пролил-глутаминил-изолейцил-пролил-пролина (19)*. а) К раствору 0,5 г пентапептида (18), 0,38 г хлоргидрата тетрапептида (6) и 0,08 г 1-оксипентриазола в 0,5 мл диметилформамида при охлаждении до 0°C прибавляли раствор 0,15 г *N,N'*-дидицилгексилкарбо-

диметида в 0,5 мл диметилформаида, выдерживали 20 мин при 0° С и 20 ч при 18° С. Защищенный нонапептид (0,85 г) высаживали избытком этилацетата и очищали хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование, хлороформ — (метанол — хлороформ), 26 : 74). Получали 0,26 г (30%) чистого нонапептида (19).

б) К суспензии 0,12 г пентапептида (18) и 0,1 г хлоргидрата тетрапептида (6) в 0,5 мл свежеперегнанного сухого хлороформа прибавляли 0,05 г N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина и оставляли на 18 ч при 18–20° С. Продукт реакции (0,23 г) высаживали избытком этилацетата и очищали хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование, хлороформ — (метанол — хлороформ), 26 : 74). Получали 0,15 г (53%) защищенного нонапептида (19).

в) С 0,3 г защищенного октапептида (20) удаляли *трет*-бутилоксикарбонильную группу, как описано в опыте 9, и получали 0,27 г хлоргидрата октапептида (21). К раствору 0,27 г хлоргидрата октапептида (21) и 0,14 г 2,4,5-трихлорфенилового эфира бензилоксикарбонил-пироглутаминовой кислоты в 1 мл диметилформаида при перемешивании добавляли по каплям 0,08 мл триэтиламина. Выдерживали 18 ч при 18–20° С и избытком этилацетата высаживали защищенный нонапептид, который очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле.

13. Хлоргидрат бензилового эфира пироглутамил-триптофил-пролил-аргинил-пролил-глутаминил-изолейцил-пролил-пролина (22) получали в условиях опыта 12в конденсацией 0,14 г хлоргидрата октапептида (21) с 0,05 г 2,4,5-трихлорфенилового эфира пироглутаминовой кислоты. Продукт реакции очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле.

14. Пироглутамил-триптофил-пролил-аргинил-пролил-глутаминил-изолейцил-пролил-пролин (1). а) Раствор 0,1 г защищенного нонапептида (19) в 3 мл метанола гидрировали над Pd-чернью в течение 8 ч. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали, остаток пересаждали из метанола эфиром. Отфильтровывали 0,08 г (97%) хлоргидрата пептида (1), который после очистки на биогеле P-2 в 2% уксусной кислоте растворяли в 1 мл метанола и пропускали через 2 мл смолы IRA-410 в OH⁻-форме. Элюат упаривали, остаток пересаждали из метанола эфиром, получали 0,058 г (75%) свободного нонапептида (1). Аминокислотный анализ: Glu 1,98; Pro 4,05; Ile 1,08; Arg 0,99; Trp 0,97*.

Аналогично свободный нонапептид (1) получали из защищенного нонапептида (22). Аминокислотный анализ: Glu 2,01; Pro 3,99; Ile 1,02; Arg 0,98; Trp 0,96*.

б) Раствор 0,05 г защищенного нонапептида (13) в 2 мл метанола гидрировали над Pd-чернью в течение 6 ч. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали в вакууме, остаток пересаждали из метанола эфиром. Получали 0,036 г (80%) свободного нонапептида (1). Аминокислотный анализ: Glu 1,99; Pro 4,02; Ile 0,99; Arg 1,04; Trp 0,98*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ondetti M. A., Williams N. J., Sabo E. F., Pluščec J., Weaver E. R., Kocy O. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4033–4039.
2. Ondetti M. A., Pluščec J. (1974) Pat. USA 3832337.
3. Pluščec J., Weaver E. R., Williams N., Sabo E. F., Kocy O., Ondetti M. A. (1973) in: *Peptides 1972* (Hanson H., Jakubke H. D., eds), p. 403–407, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam.
4. Berse C., Piche L., Uchiyama A. (1960) *Can. J. Chem.*, **38**, 1946–1950.
5. Iselin B. M. (1963) *Proc. 6th Europ. Symp. on Peptides*, Athens, p. 27, Pergamon Press.
6. Keil B., Zikán J., Rexová L., Šorm F. (1962) *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **27**, 1678–1686.
7. Wieland T., Gebert U. (1966) *Lieb. Ann.*, **700**, 157–173.
8. Kuhn R., Butula I. (1968) *Angew. Chem.*, **80**, 189–190.

* Содержание триптофана определяли спектрофотометрически [16].

9. Alakhov J. B., Kiryushkin A. A., Lipkin V. M. (1970) Chem. Communs, 406-407.
10. Севастьянова Н. Н., Липкин Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. (1977) Биооргани. химия, 3, 473-484.
11. Вировец С. И., Мартынов В. Ф., Титов М. И. (1968) Ж. общ. химии, 38, 2337.
12. Филатова М. П., Крит Н. А., Сучкова Г. С., Равдель Г. А., Иванов В. Т. (1975) Биооргани. химия, 1, 437-446.
13. Равдель Г. А., Монапова Н. Н., Крит Н. А., Филатова М. П., Лисункин Ю. И., Иванов В. Т. (1975) Химия природных соединений, 47-56.
14. Löw M., Kisfaludy L., Sohár P. (1978) Z. Physiol. Chem., 359, 1643-1651.
15. Kurath P., Thomas A. M. (1973) Helv. chim. acta, 56, 1656-1661.
16. Wetlaufer D. B. (1962) in: Adv. in Protein Chem., vol. 17, pp. 375-380. Acad. Press, N. Y.— London.

Поступила в редакцию
16.I.1980

SYNTHESIS OF NONAPEPTIDE INHIBITOR OF PEPTIDYLDIPEPTIDASE

FILATOVA M. P., KRIT N. A., KOVALCHUK O. V.,
KOMAROVA O. M., REISSMANN Z.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow; Friedrich Schiller University, Jena*

The synthesis of nonapeptide inhibitor of peptidyl dipeptidase has been carried out by three different ways. The optimal one involves the synthesis of C-terminal octapeptide from two tetrapeptide fragments and its coupling with pyroglutamic acid at the last stage. It is found that the condensation of peptides containing N-terminal N-acylated pyroglutamic acid under certain conditions lead to the opening of lactam ring and the formation of glutamic acid.