



УДК 547.964.4.057:577.152.343.042

СИНТЕЗ ТИРОЗИНСОДЕРЖАЩИХ АНАЛОГОВ НОНАПЕПТИДНОГО  
ИНГИБИТОРА ПЕПТИДИЛДИПЕПТИДАЗЫ*Филатова М. П., Ертн Н. А., Гаврилова Г. В.,  
Бесчастная Н. В.**Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР, Москва**Рейссманн З.**Университет им. Ф. Шиллера, Йена, ГДР*

Осуществлен синтез аналогов нонапептидного ингибитора пептидилдипептидазы, SQ 20 881, содержащих остаток тирозина в положениях 4, 6 или 7 пептидной цепи. Отмечено образование побочных урестановых производных при создании пептидной связи методом смешанных ангидридов между пространственно затрудненными карбоксильными и аминокислотными компонентами.

В продолжение исследований по изучению связи структуры с активностью пептидного ингибитора SQ 20881 пептидилдипептидазы (КФ 3.4.15.1) [1] нонапептида <Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro (I) осуществлен синтез его аналогов, содержащих остаток тирозина в положениях 7, 6 или 4 (соответственно соединения (II)–(IV)).

При рассмотрении гипотетической модели активного центра пептидилдипептидазы было высказано предположение, что основной субстратсвязывающий участок фермента эффективно взаимодействует с ароматическими или разветвленными алифатическими группами боковых цепей аминокислотных остатков, находящихся в положении 7 молекулы нонапептидного субстрата или ингибитора [2]. Что касается аминокислотных остатков в положениях 4 и 6, то известно, что они также важны для связывания с ферментом, но природа вспомогательного субстратсвязывающего участка фермента, с которым они взаимодействуют, пока четко не охарактеризована.

Предполагалось, что введение в положения 4, 6 и 7 пептидной цепи нонапептида (I) остатка тирозина, содержащего как ароматическую группу, так и фенольный гидроксил, который способен участвовать в связывании с ферментом, позволит получить дополнительную информацию о специфичности субстратсвязывающих участков пептидилдипептидазы. Кроме того, исследование флуоресцентных спектров Trp-содержащих аналогов нонапептида (I) позволит получить данные о конформационных особенностях молекул, способных связываться с этим ферментом.

Синтез аналогов (II)–(IV) осуществляли по схемам 1–3. Для построения пептидной цепи использовали преимущественно метод фрагментной конденсации, а присоединение N-концевой пироглутаминовой кислоты для всех аналогов проводили на последней стадии с использованием трихлорфениловых эфиров [3]. Синтез защищенных октапептидов (7) и (13) осуществляли конденсацией тетрапептида (6) соответственно с тетрапептидами (5) и (12) в присутствии EEDQ (схемы 1 и 2); октапептид (22) (схема 3) получали последовательным присоединением двух дипептидных

Сокращения: EEDQ — N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохиолин, OTrp — 2,4,5-трихлорфенокси-, OPr — пентафторфенокси-, DMF — диметилформамид, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; кроме того, использованы стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC — IUB.

фрагментов (17) и (21) к С-концевому тетрапептиду (16). Синтез дипептидов (17) и (20) осуществляли методом активированных эфиров в хлороформе, защищая карбоксильную группу пролина солеобразованием с триэтиламинном.

Для синтеза тетрапептида Вос-Тур(ОВз1)-Ile-Pro-Pro-ОВз1 (11) (схема 2) первоначально нами был выбран метод смешанных ангидридов с изобутилхлорформиаом. Известно, что взаимодействие смешанного ангидрида (А) с аминокомпонентом (В) может протекать по двум направлениям (1 или 2, схема 4) с образованием нужного пептида (В) или побочного продукта (Г).

Исследования этой реакции показали [4, 5], что преимущественную тенденцию к образованию уретанового производного Г имеют вторичные и пространственно затрудненные амины. В то же время Боданский с сотр. [6], изучая побочные реакции в ходе пептидного синтеза методом смешанных ангидридов, установил, что природа аминокомпонента мало сказывается на выходе соединений типа Г, тогда как стергическая затрудненность карбоксильного компонента оказывает решающее влияние на соотношение образующихся продуктов В и Г.

Первоначально осуществленная нами реакция между Вос-Тур(ОВз1)-ОН и трипептидом Н-Сле-Pro-Pro-ОВз1 (10) при активации карбоксильного компонента изобутилхлорформиаом в хлороформе при  $-15^{\circ}\text{C}$  в течение 3 мин привела к образованию в качестве основного продукта реакции уретанового производного типа Г с выходом 62% (табл. 1). Строение последнего доказывали на основании идентичности его хроматографической подвижности в трех системах с продуктом реакции изобутилхлорформиаата с трипептидом (10) в присутствии 1 экв. триэтиламина, элементного анализа, а также отсутствия изменений соединения при обработке раствором НС1 в диоксане в условиях удаления Вос-группы. Нам удалось повысить выход желаемого тетрапептида (11) (продукт В) до 40%, увеличив время образования смешанного ангидрида до 15–20 мин; при этом выход побочного продукта снизился до 27%. Дальнейшее увеличение времени активации не изменяло соотношения продуктов реакции.

Чтобы оценить влияние аминокомпонента на выход конечных продуктов, в проводимой нами реакции вместо трипептида (10) взяли *n*-нитробеизидовый эфир фенилаланина. Оказалось, что в этом случае выход дипептида Вос-Тур(ОВз1)-Phe-ОНб без примеси побочного продукта составляет 80%, если время образования смешанного ангидрида равно 20 мин; в то же время при активации Вос-Тур(ОВз1)-ОН в течение 3 мин выход дипептида снижался до 50% и было выделено 25% уретанового производного типа Г (табл. 1).

Заметная роль структуры карбоксильного компонента в определении направления реакции его смешанного ангидрида (А) с трипептидом (10) была подтверждена путем сравнения выходов тетра- и пентапептидов (табл. 1). В случае взаимодействия трипептида (10) с Вос-Trp-Pro-ОН также было отмечено влияние времени образования смешанного ангидрида на соотношение продуктов реакции.

Изучение влияния других факторов на протекание реакции пептидообразования Вос-Тур(ОВз1)-ОН с трипептидом (10) в присутствии изобутилхлорформиаата показало, что изменение растворителя (переход от хлороформа к тетрагидрофурану или DMF), температуры образования смешанного ангидрида (снижение до  $-40^{\circ}\text{C}$  и повышение до  $-5^{\circ}\text{C}$ ) и основания (замена N-метилморфолина на триэтиламин) заметно не влияют на соотношение образующихся продуктов реакции.

При использовании для получения тетрапептида (11) модифицированного метода смешанных ангидридов (REMA) [7] реакция также не протекала однозначно: выход желаемого пептида составил 45%, а побочного продукта — 21% (табл. 1).

Проведенные нами исследования показали, что при образовании пептидной связи с участием пространственно затрудненных амино- и/или карбоксильных компонентов метод смешанных ангидридов не является оптимальным, так как он дает высокий выход побочного уретанового

Схема 1

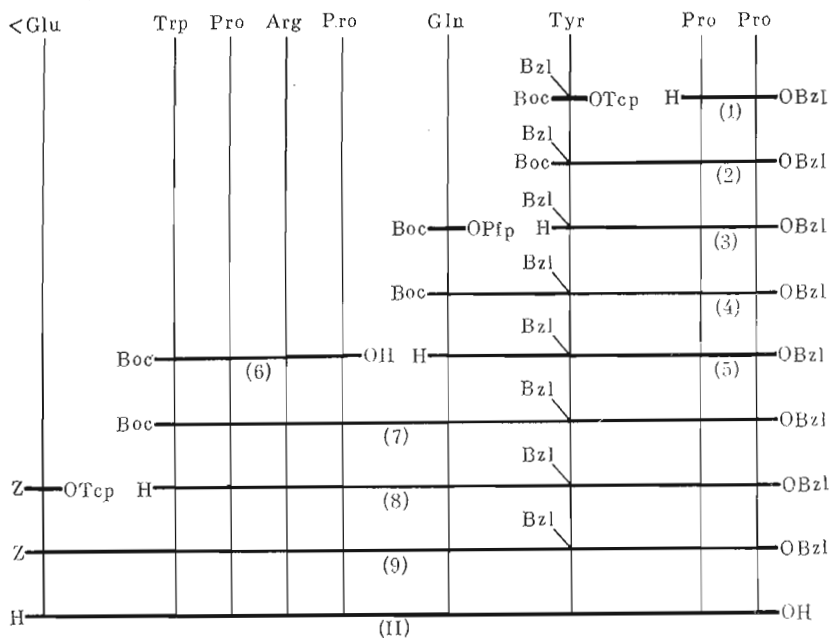
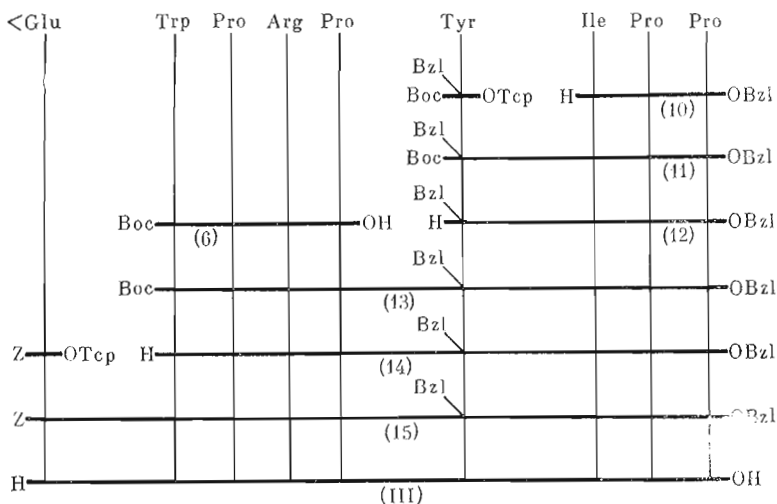


Схема 2



производного. При необходимости использования этого метода для пространственно затрудненных компонентов следует специально определять оптимальное время образования смешанного ангидрида.

Поскольку во всех изученных реакциях выход тетрапептида (11) был невысок, в дальнейшем этот тетрапептид получали методом активированных эфиров (выход 75% после очистки на силикагеле). Метод активированных эфиров был использован также для получения трипептида (2), тетрапептида (4) (схема 1) и октапептида (22) (схема 3). Гексапептид (18) был получен методом смешанных ангидридов без примеси побочного продукта.

Вос-защитные группы удаляли действием HCl в  $\text{CH}_3\text{COOH}$  в течение 25–40 мин, а при наличии в пептидной цепи остатков триптофана или тирозина добавляли анизол. При снятии защитных групп с помощью ацидолитических реагентов с пептидов, содержащих O-бензилтирозин, существует опасность O→C-миграции бензильной группы. Хотя особенно высок процент образования 3-бензилтирозила при действии на  $\text{Tyr}(\text{OBzl})$ -содержащие пептиды HF и трифторуксусной кислоты, однако и при

Схема 3

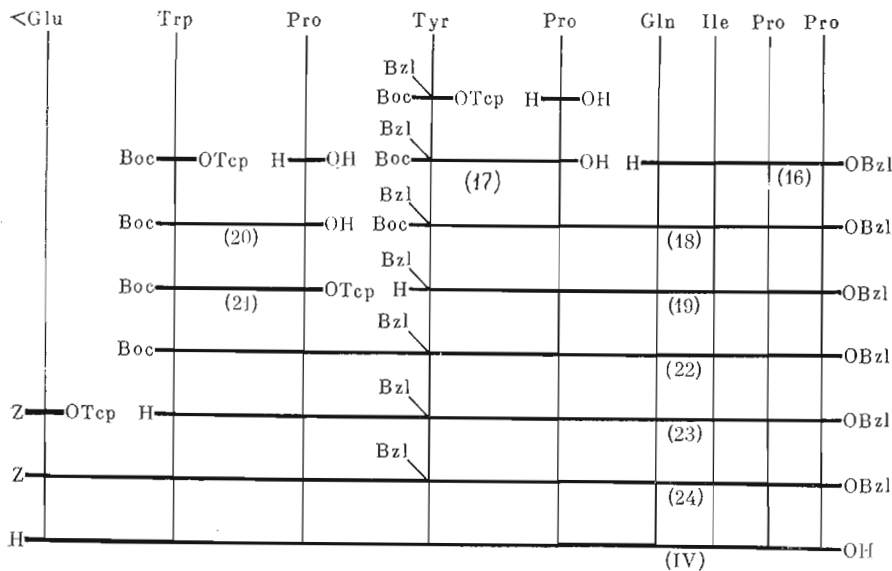
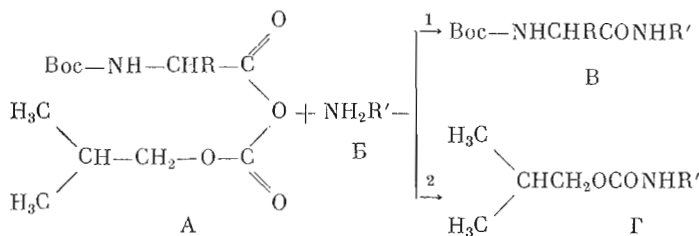


Схема 4



использовании HCl в  $\text{CH}_3\text{COOH}$  в отдельных случаях было отмечено образование этого побочного продукта [8–10]. Мы контролировали возможность миграции бензильной группы с помощью ТСХ сравнением продукта реакции с заведомо полученной смесью с определенным соотношением *O*-бензилтирозина, 3-бензилтирозина и тирозина в системе, предложенной Боданским с сотр. [11], а также хроматографией на бумаге в системах, использованных для разделения тирозина и 3-бензилтирозина [12]. Было показано, что при действии на  $\text{Boc-Tyr(OBzl)-OH}$  в течение 1,5 ч 2 н. HCl в уксусной кислоте или диоксане в присутствии анизолу образуется только *O*-бензилтирозин, а при действии этих реагентов в течение 3 ч появляются следовые количества тирозина и 3-бензилтирозина. Об отсутствии модификации остатков тирозина свидетельствует и хороший аминокислотный анализ аналогов (II)–(IV).

Таблица 1

Исследование реакции получения пептида (В) из смешанного ангидрида (А) карбоксильного компонента с изобутилхлорформатом и аминок компонента (Б)

Карбоксильный компонент	Аминок компонент (Б)	Время образования А, мин	Выход продуктов, %	
			В	Г *
$\text{Boc-Tyr(Bzl)-OH}$	$\text{H-Ile-Pro-Pro-OBzl}$ (10)	3	–	62
»	»	20	40	27
»	»	2 (РЕМА-метод)	45	21
»	$\text{H-Phe-ONb}$	3	50	25
»	»	20	80	–
$\text{Boc-Trp-Pro-OH}$	$\text{H-Ile-Pro-Pro-OBzl}$	3	50	22
»	»	20	70	–

\* Г — побочный продукт уретанового типа (см. текст).

Бензилоксикарбонильную и бензилоксигруппы с защищенных нонапептидов (9), (15) и (24) удаляли на последней стадии каталитическим гидрированием над Pd-черью, после чего свободные нонапептиды (II) — (IV) хроматографировали на биогеле Р-2 в 1% уксусной кислоте.

Чистоту конечных продуктов (II) — (IV) контролировали ТСХ, аминокислотным анализом, высоковольтным электрофорезом при pH 2,4 и 6,5 и ВЭЖХ. Характеристики полученных соединений приведены в табл. 2.

Исследование способности синтезированных аналогов ингибировать активность пептидилдипептидазы показало, что аналоги (II) и (III) эквивалентны природному нонапептиду (I), тогда как ингибирующая активность аналога (IV) ниже активности (I) на порядок\*.

### Экспериментальная часть

Температуры плавления определены на нагревательном столике Voëtius (ГДР) и приведены без исправления. Индивидуальность полученных соединений проверяли ТСХ на пластинках фирмы Merck в системах хлороформ — метанол, 9:1 (А), хлороформ — метанол —  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 8:1:1 (Б), *n*-бутанол —  $\text{CH}_3\text{COOH}$  —  $\text{H}_2\text{O}$ , 5:2:3 и 4:1:1 (В и Г) и *n*-бутанол — пиридин —  $\text{CH}_3\text{COOH}$  —  $\text{H}_2\text{O}$ , 5:5:1:3 (Д) и электрофорезом на бумаге FN-17 в горизонтальном приборе при градиенте потенциала  $24 \text{ В} \cdot \text{см}^{-1}$  в 1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pH 2,4) и пиридин-ацетатном буфере (pH 6,5). Для колоночной хроматографии использовали силикагель L 40—100 мкм (Chemapol, Чехословакия). ВЭЖХ проводили на смоле Lichrosorb RP-18 (10 мкм) в 0,1 М фосфатном буфере (pH 2,1) на приборе фирмы Knauer (Западный Берлин). Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 241 (США). Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных в запаянных ампулах 6 н. HCl при  $110^\circ\text{C}$  в течение 24 ч, выполняли на автоматическом анализаторе Biosal BC201 (ФРГ); содержание триптофана определяли спектрофотометрически [13].

Растворы веществ в органических растворителях высушивали над  $\text{MgSO}_4$  и упаривали в вакууме при температуре не выше  $40^\circ\text{C}$ .

1. *Boc-Tyr(Bzl)-Pro-Pro-OBzl* (2). К охлажденному до  $0$ – $-5^\circ\text{C}$  раствору 1,46 г (2,66 ммоль) *Boc-Tyr(Bzl)-O-Ter* [14] и 1 г (2,96 ммоль) HCl·Pro-Pro-OBzl (1) [15] в 4,5 мл DMF прибавляли при перемешивании 0,42 мл (3 ммоль) триэтиламина. Выдерживали 1 ч при  $0^\circ\text{C}$ , поддерживая pH реакционной смеси не ниже 8, и оставляли на 20 ч при  $20^\circ\text{C}$ . К реакционной смеси приливали 60 мл этилацетата, промывали водой, 10% лимонной кислотой, водой, 8%  $\text{NaHCO}_3$ , водой, сушили и упаривали. Получали 1,76 г защищенного трипептида в виде масла, которое очищали хроматографией на силикагеле в хлороформе.

2. *HCl-Tyr(Bzl)-Pro-Pro-OBzl* (3). К раствору 0,77 г (1,2 ммоль) трипептида (2) в 4 мл диоксана приливали 0,8 мл анизола и 4 мл 4 н. HCl в диоксане. Выдерживали 35 мин при  $18^\circ\text{C}$ , упаривали, декантировали несколько раз сухим эфиром, сушили над  $\text{KOH}$  и получали 0,59 г хлоргидрата трипептида (3).

3. *Boc-Gln-Tyr(Bzl)-Pro-Pro-OBzl* (4). К охлажденному до  $-10^\circ\text{C}$  раствору 0,56 г (0,95 ммоль) хлоргидрата трипептида (3) и 0,49 г (1,19 ммоль) *Boc-Gln-OPfp* [16] в 4,5 мл DMF прибавляли по каплям 0,34 мл (2,52 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при  $0^\circ\text{C}$  и 20 ч при  $18^\circ\text{C}$ . Добавляли 60 мл этилацетата, промывали водой, 10% лимонной кислотой, водой, 8%  $\text{NaHCO}_3$ , водой, сушили, упаривали и получали 0,47 г продукта в виде масла, которое очищали хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование хлороформ — 4% метанол в хлороформе).

4. *HCl-Gln-Tyr(Bzl)-Pro-Pro-OBzl* (5). К раствору 0,18 г (0,23 ммоль) тетрапептида (4) в 0,8 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$  приливали 0,1 мл анизола и 0,8 мл

\* Результаты биохимических исследований синтезированных аналогов будут представлены в отдельном сообщении.

## Характеристика синтезированных соединений

Соединение	Брутто-формула	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$ , град (MeOH) *	Выход **, %
(2) Boc-Tyr (Bzl)-Pro-Pro-OBzl	$C_{38}H_{45}N_3O_7$	Аморфн.	-95,6	62
(3) HCl-Tyr (Bzl)-Pro-Pro-OBzl	$C_{33}H_{38}N_3O_5Cl$	»	-85,5	90
(4) Boc-Gln-Tyr (Bzl)-Pro-Pro-OBzl	$C_{43}H_{53}N_3O_9$	»	-93,5	51
(5) HCl-Gln-Tyr (Bzl)-Pro-Pro-OBzl	$C_{38}H_{46}N_3O_7Cl$	87-90	-70,0	74
(7) Boc-Trp-Pro-Arg (HCl)-Pro-Gln-Tyr (Bzl)-Pro-Pro-OBzl	$C_{70}H_{90}N_{13}O_{13}Cl$	157-158	-114,3	62
(8) HCl-Trp-Pro-Arg (HCl)-Pro-Gln-Tyr (Bzl)-Pro-Pro-OBzl	$C_{65}H_{83}N_{13}O_{11}Cl_2$	178-180	-104,5	96
(9) Z-<Glu-Trp-Pro-Arg (HCl)-Pro-Gln-Tyr (Bzl)-Pro-Pro-OBzl	$C_{78}H_{93}N_{14}O_{15}Cl$	160-162	-93,2	70
(14) Boc-Tyr (Bzl)-Ile-Pro-Pro-OBzl	$C_{41}H_{56}N_4O_8$	70-72	-108,3	75
(12) HCl-Tyr (Bzl)-Ile-Pro-Pro-OBzl	$C_{39}H_{49}N_4O_6Cl$	115-117	-102,2	93
(13) Boc-Trp-Pro-Arg (HCl)-Pro-Tyr (Bzl)-Ile-Pro-Pro-OBzl	$C_{71}H_{93}N_{12}O_{13}Cl$	152-154	-123,0	65
(14) HCl-Trp-Pro-Arg (HCl)-Pro-Tyr (Bzl)-Ile-Pro-Pro-OBzl	$C_{66}H_{86}N_{12}O_{10}Cl_2$	161-162	-119,2	94
(15) Z-<Glu-Trp-Pro-Arg (HCl)-Pro-Tyr (Bzl)-Ile-Pro-Pro-OBzl	$C_{79}H_{98}N_{13}O_{14}Cl$	164-168	-122,3	60
(17) Boc-Tyr (Bzl)-Pro-OH	$C_{36}H_{42}N_2O_6$	78-80	-17,8	68
(18) Boc-Tyr (Bzl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl	$C_{54}H_{71}N_7O_{11}$	110-111	-82,3	64
(19) HCl-Tyr (Bzl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl	$C_{49}H_{64}N_7O_9Cl$	142-143	-110,2	97
(20) Boc-Trp-Pro-OH	$C_{21}H_{27}N_3O_5$	120-122	-26,6	80
(24) Boc-Trp-Pro-OH	$C_{37}H_{58}N_3O_5Cl_3$	98-100	-7,2	74
(22) Boc-Trp-Pro-Tyr (Bzl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl	$C_{70}H_{88}N_{10}O_{13}$	135-136	-108,6	73
(23) HCl-Trp-Pro-Tyr (Bzl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl	$C_{65}H_{81}N_{10}O_{11}Cl$	163-165	-111,2	90
(24) Z-<Glu-Trp-Pro-Tyr (Bzl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl	$C_{78}H_{92}N_{11}O_{15}$	140-142	-129,1	58
(II) <Glu-Trp-Pro-Arg (HCl)-Pro-Gln-Tyr-Pro-Pro-OH	$C_{63}H_{81}N_{10}O_{13}Cl$	199-201	-95,7	70 *
(III) <Glu-Trp-Pro-Arg (HCl)-Pro-Tyr-Ile-Pro-Pro-OH	$C_{57}H_{78}N_{13}O_{12}Cl$	220-221	-120,3	72 *
(IV) <Glu-Trp-Pro-Tyr-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH	$C_{56}H_{73}N_{11}O_{13}$	194-195	-121,6	75 *

\* с=1 для соединений (3), (4), (5), (17), (18), (20), (21), для остальных с=0,5.

\*\* Выход для всех соединений, кроме (3), (8), (12), (14), (19)-(21), (23), приведен после хроматографической очистки.

4 н. HCl/CH<sub>3</sub>COOH, выдерживали 40 мин при 18° С, упаривали, остаток растирали с абс. эфиром и отфильтровывали 0,12 г хлоргидрата тетрапептида (5).

5. *Woc-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Tyr(Bzl)-Pro-Pro-OBzl (7)*. К суспензии 0,088 г (0,135 ммоль) *Woc-Trp-Pro-Arg-Pro-OH* (6) [3] и 0,095 г (0,132 ммоль) хлоргидрата тетрапептида (5) в 1,5 мл свежеперегнанного хлороформа прибавляли при -5° С 0,04 г (0,17 ммоль) EEDQ, выдерживали 30 мин при этой температуре и 20 ч при 18° С; растворитель упаривали, продукт осаждали сухим эфиром из метанола и получали 0,17 г защищенного октапептида (7), который очищали на сефадексе LH-20 в метаноле; *R<sub>f</sub>* 0,23 (А), 0,6 (Г).

6. *Z-<Glu-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Tyr(Bzl)-Pro-Pro-OBzl (9)*. К раствору 0,114 г (0,088 ммоль) хлоргидрата октапептида (8), полученному в условиях опыта 4, и 0,053 г (0,12 ммоль) *Z-<Glu-OTcp* [17] в 0,2 мл DMF при охлаждении до 0° ÷ -5° С прибавляли 0,018 мл (0,13 ммоль) триэтиламина и оставляли на 48 ч при 20° С. Продукт реакции осаждали этилацетатом, очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле и получали 0,096 г хроматографически индивидуального нонапептида (9); *R<sub>f</sub>* 0,24 (Б), 0,56 (В), 0,74 (Д).

7. *<Glu-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Tyr-Pro-Pro-OH (II)*. 0,058 г (0,09 ммоль) защищенного нонапептида (9) гидрировали в метаноле над Pd-чернью в течение 14 ч. Катализатор отфильтровывали, растворитель упаривали, остаток пересаждали из метанола эфиром и хроматографировали на биогеле Р-2 в 2% CH<sub>3</sub>COOH; получали 0,032 г хлоргидрата нонапептида (II). Аминокислотный анализ: Glu 1,96, Pro 4,01, Arg 0,93, Tyr 0,95, Trp 0,93.

8. *Woc-Tyr(Bzl)-Ile-Pro-Pro-OBzl (11)*. а) К раствору 0,26 г (0,7 ммоль) *Woc-Tyr(Bzl)-OH* в 3 мл свежеперегнанного хлороформа, охлажденному до -15° С, при перемешивании прибавляли 0,093 мл (0,7 ммоль) изобутилового эфира хлорогальной кислоты и 0,072 мл (0,7 ммоль) N-метилморфолина, перемешивали 20 мин при этой температуре, затем приливали охлажденный до -15° С раствор 0,32 г (0,7 ммоль) HCl-Ile-Pro-Pro-OBzl (10) [14] и 0,072 мл (0,7 ммоль) N-метилморфолина в 2 мл хлороформа. Перемешивали 30 мин при -15° С, 1 ч при 0° С и оставляли на 20 ч при 5° С. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 20 мл этилацетата, промывали водой, 8% NaHCO<sub>3</sub>, водой, 10% лимонной кислотой, водой, сушили, упаривали и остаток хроматографировали на силикагеле (градиентное элюирование хлороформ - 0,5% метанол в хлороформе). Получали 0,1 г (27%) (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>OCO-Ile-Pro-Pro-OBzl в виде масла (продукт Г, схема 4) с *R<sub>f</sub>* 0,72 (А), 0,62 (этилацетат - хлороформ, 2:3), 0,66 (хлороформ - гексан - CH<sub>3</sub>COOH, 8:1:1) и 0,21 г (40%) тетрапептида (11) с *R<sub>f</sub>* 0,5 (А), 0,34 (этилацетат - хлороформ, 2:3).

б) К раствору 0,45 г (1 ммоль) хлоргидрата трипептида (10) и 0,55 г (1 ммоль) *Woc-Tyr(Bzl)-OTcp* в 1,5 мл DMF, охлажденному до 0° С, при перемешивании прибавляли 0,14 мл (1 ммоль) триэтиламина, выдерживали 20 ч при 18° С, приливали 30 мл этилацетата, промывали водой, 8% NaHCO<sub>3</sub>, водой, 10% лимонной кислотой, водой, сушили, упаривали и хроматографировали на силикагеле (градиентное элюирование хлороформ - 2% метанол в хлороформе). Выход тетрапептида (11) 75%.

9. *Woc-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Tyr(Bzl)-Ile-Pro-Pro-OBzl (13)*. Из 0,3 г (0,425 ммоль) хлоргидрата тетрапептида (12), полученного из защищенного тетрапептида (11) в условиях опыта 2, и 0,28 г (0,43 ммоль) тетрапептида (6) в условиях опыта 5 получали 0,37 г хроматографически чистого октапептида (13); *R<sub>f</sub>* 0,2 (А), 0,55 (В).

10. *Z-<Glu-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Tyr(Bzl)-Ile-Pro-Pro-OBzl (15)*. Из 0,31 г (0,24 ммоль) хлоргидрата октапептида (14), полученного из защищенного октапептида (13) в условиях опыта 4, и 0,14 г (0,316 ммоль) *Z-<Glu-OTcp* в условиях опыта 6 получали 0,216 г хроматографически чистого нонапептида (15); *R<sub>f</sub>* 0,43 (А), 0,59 (В), 0,81 (Д).

11. *<Glu-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Tyr-Ile-Pro-Pro-OBzl(III)*. Из 0,53 г (0,036 ммоль) защищенного нонапептида (15) в условиях опыта 7 получа-

ли 0,029 г хлоргидрата нонапептида (III). Аминокислотный анализ: Glu 1,02, Pro 3,94, Arg 0,98, Ile 0,97, Tyr 0,97, Trp 0,94.

12. *Woc-Tyr(Bzl)-Pro-OH* (17). К суспензии 0,9 г (7,8 ммоль) пролина в 20 мл свежеперегнанного хлороформа при 0° С приливали 1,09 мл (7,8 ммоль) триэтиламина, затем прибавляли 4,32 г (7,8 ммоль) *Woc-Tyr(Bzl)-OTсp* и 1,09 мл (7,8 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 18 ч при 18° С, упаривали, остаток растворяли в 20 мл этилацетата и трижды экстрагировали водой. Водный слой подкисляли 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до pH 3–4, образовавшееся масло экстрагировали этилацетатом, этилацетатный раствор промывали водой, сушили, упаривали и получали 4,66 г аморфного продукта, который хроматографировали на силикагеле (градиентное элюирование хлороформ–2,5% метанол в хлороформе).

13. *Woc-Tyr(Bzl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (18). К охлажденному до –15° С раствору 0,435 г (0,93 ммоль) *Woc-Tyr(Bzl)-Pro-OH* и 0,13 мл (0,93 ммоль) триэтиламина в 5 мл свежеперегнанного хлороформа приливали 0,13 мл (0,93 ммоль) изобутилхлорформата, перемешивали при этой температуре 15 мин и добавляли по каплям охлажденный до –15° С раствор 0,54 г (0,933 ммоль) HCl·Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl [3] и 0,13 мл (0,93 ммоль) триэтиламина в 5 мл хлороформа. Реакционную смесь выдерживали 15 мин при –15° С, 18 ч при 5° С и 12 ч при –5° С. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 20 мл этилацетата, промывали водой, 8% NaHCO<sub>3</sub>, водой, 10% лимонной кислотой, водой, сушили, упаривали и получали 0,73 г аморфного продукта, который очищали хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование хлороформ–3% метанол в хлороформе).

14. *Woc-Trp-Pro-OH* (20). Из 0,5 г (4,35 ммоль) пролина и 1,82 г (3,78 ммоль) *Woc-Trp-OTсp* [14] в условиях опыта 12 получали 1,57 г аморфного продукта, который растворяли в 30 мл этилацетата, этилацетатный раствор трижды экстрагировали 8% NaHCO<sub>3</sub>, бикарбонатный раствор подкисляли раствором, содержащим 1 М KHSO<sub>4</sub> и 1 М K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 : 2), выдерживали ~3 ч при 0° С и отфильтровывали 1,4 г дипептида (20). Молекулярный вес: найдено 393 (титрование 0,01 н. NaOH), вычислено 401.

15. *Woc-Trp-Pro-OTсp* (21). К охлажденному до 0° С раствору 0,4 г (1 ммоль) дипептида (20) и 0,2 г (1,01 ммоль) 2, 4, 5-трихлорфенола в 5 мл тетрагидрофурана приливали раствор 0,21 г (1,02 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида в 2 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь выдерживали 0,5 ч при 0° С и 2 ч при 18° С. Дициклогексимочевину отфильтровывали, растворитель упаривали, остаток кристаллизовали из этанола.

16. *Woc-Trp-Pro-Tyr(Bzl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (22). К охлажденному до 0° С раствору 0,25 г (0,43 ммоль) эфира (21) и 0,37 г (0,37 ммоль) хлоргидрата гексапептида (19), полученного из защищенного гексапептида (18) в условиях опыта 2, в 2 мл DMF приливали 0,052 мл (0,37 ммоль) триэтиламина, выдерживали 20 ч при 18° С, приливали 30 мл этилацетата, промывали водой, 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, водой, сушили, упаривали. К остатку приливали сухой эфир и отфильтровывали 0,42 г защищенного октапептида; который очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле, и получали 0,34 г хроматографически чистого октапептида (22); R<sub>f</sub> 0,2 (A), 0,61 (хлороформ–ацетон–метанол, 7 : 1,5 : 1,5).

17. *Z-<Glu-Trp-Pro-Tyr(Bzl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (24). К раствору 0,079 г (0,065 ммоль) хлоргидрата октапептида (23), полученного из защищенного октапептида (22) в условиях опыта 4, и 0,04 г (0,09 ммоль) Z-<Glu-OTсp в 0,2 мл DMF прибавляли при 0° С 0,012 мл (0,09 ммоль) триэтиламина, выдерживали 48 ч при 20° С, приливали 20 мл этилацетата, промывали водой, 8% NaHCO<sub>3</sub>, водой, 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, водой, сушили, упаривали и остаток переосаждали из метанола эфиром. Отфильтровывали 0,064 г защищенного нонапептида, который подвергали гель-хроматографии на сефадексе LH-20 в метаноле. Получали 0,053 г хроматографически чистого нонапептида (24); R<sub>f</sub> 0,65 (B), 0,64 (B), 0,82 (D).



18. <Glu-Trp-Pro-Tyr-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH(IV). Из 0,04 г (0,028 ммоль) защищенного нонапептида (24) в условиях опыта 7 получили 0,023 г свободного нонапептида (IV). Аминокислотный анализ: Glu 1,96, Pro 3,89, Ile 0,97, Tyr 0,98, Trp 0,95.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Филатова М. П., Криг Н. А., Бесчастная Н. В., Блохина А. В., Орехович В. И., Рейссманн З. Тез. Всес. симпозиума «Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов». Рига, 1982, с. 84.
2. Cushman D. W., Cheung H. S., Sabo E. F., Ondetti M. A. In: Angiotensin converting enzyme inhibitors. Mechanisms of action and clinical implications / Ed. Horowitz Z. P. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1981, p. 3-25.
3. Филатова М. П., Криг Н. А., Ковальчук О. В., Комарова О. М., Рейссманн З. Био-орган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1605-1614.
4. Leister N. A., Tarbell D. S. J. Org. Chem., 1958, v. 23, № 8, p. 1152-1155.
5. Yajima H., Mizokami N., Okada J., Kawasaki K. Chem. Pharm. Bull., 1969, v. 17, № 9, p. 1958-1962.
6. Bodanszky M., Tolle J. C. Int. J. Peptide and Protein Res., 1977, v. 10, № 5, p. 380-385.
7. van Zon A., Beyerman H. C. Helv. chim. acta, 1973, v. 56, № 5, p. 1729-1740.
8. Yonezawa H., Takahashi N., Ohno M., Izumiya N. Int. J. Peptide and Protein Res., 1978, v. 11, № 1, p. 19-27.
9. Sorup P., Braae H., Villemoes P., Christensen T. Acta chem. scand., B, 1979, v. 33, № 9, p. 653-663.
10. Schoknecht W., Albert K., Yung G., Bayer E. Lieb. Ann., 1982, № 8, S. 1514-1531.
11. Bodanszky M., Tolle J. C., Deshname S. S., Bodanszky A. Int. J. Peptide and Protein Res., 1978, v. 12, № 1, p. 57-69.
12. Iselin B. Helv. chim. acta, 1962, v. 45, № 5, p. 1510-1515.
13. Wetlaufer D. B. In: Adv. in Protein Chem. N. Y.-London: Acad. Press, 1962, v. 17, p. 375-380.
14. Broadbent W., Morley J. S., Stone B. E. J. Chem. Soc. (C), 1967, p. 2632-2636.
15. Равдель Г. А., Монапова Н. П., Криг Н. А., Филатова М. П., Лисункин Ю. И., Иванова В. Т. Химия природн. соедин., 1975, № 1, с. 47-56.
16. Kisfaludy L., Roberts J. E., Johnson R. H., Mayers G. L., Kovacs J. J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 10, p. 3563-3565.
17. Buntley P. H., Gregory H., Laird A. H., Morley J. S. J. Chem. Soc., Suppl. 2, 1964, p. 6130-6138.

Поступила в редакцию  
12.X.1983  
После доработки  
3.XI.1983

#### SYNTHESIS OF TYROSINE-CONTAINING ANALOGUES OF PEPTIDYL DIPEPTIDASE NONAPEPTIDE INHIBITOR

FILATOVA M. P., KRIG N. A., GAVRILOVA G. V.,  
BESCHASTNAYA N. V., REISSMANN S.

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

The analogues of peptidyl dipeptidase nonapeptide inhibitor SQ20881 which have tyrosine residues in positions 4, 6 or 7 of the peptide chain have been synthesized. The urethane formation was observed during peptide synthesis via mixed anhydride method with sterically hindered carboxy- or amino components.