



УДК 547.964.4.057:577.152.343.042

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНАЛОГОВ  
НОНАПЕПТИДНОГО ИНГИБИТОРА ПЕПТИДИЛДИПЕПТИДАЗЫ

Филатова М. П., Крит Н. А., Бесчастная Н. В.,  
Блохина А. В., Козлова Н. И., Павлихина Л. В.,  
Елисеєва Ю. Е., Орехович В. П., Рейссманн З.\*,  
Пегелю И.\*\*

Институт биологической и медицинской химии

Академии медицинских наук СССР, Москва;

\* Университет им. Ф. Шиллера, Йена, ГДР;

\*\* Институт фармакологии и токсикологии Университета им. В. Пика, Росток, ГДР

Осуществлен синтез пяти аналогов эффективного ингибитора пептидилдипептидазы — тепротида. Определена ингибирующая и брадикининпотенцирующая активность полученных соединений. Показана существенная роль N-концевой пироглутаминовой кислоты и положительного заряда аргинина в положении 4 для проявления биологической активности ингибитора.

В начале 70-х годов из ядов змей *Bothrops jararaca* и *Agkistrodon halys blomhoffii* был выделен ряд пептидов, которые потенцировали действие брадикинина *in vitro* и на изолированных органах. Интерес к этим соединениям возрос после того, как было показано, что они специфически тормозят активность карбоксикаптепсина (пептидилдипептидазы, КФ 3.4.15.1), ключевого фермента систем регуляции кровяного давления [1] (фермент также известен в литературе как ангиотензинпревращающий фермент или кининаза II).

Наиболее активным из пептидов этого ряда оказался нонапептид (I) (см. табл. 1), известный в литературе как BPP<sub>9a</sub>, SQ 20881 или тепротид. Он является специфическим конкурентным ингибитором пептидилдипептидазы и не влияет на биологическое действие ангиотензина II и других вазоактивных соединений [2]. Показано, что тепротид снижает кровяное давление при гипертензивных состояниях организма [2–4]. Однако использование его в качестве антигипертензивного средства для лечения гипертонии ограничено, поскольку он активен только при парентеральном введении. Тем не менее тепротид широко используется для выяснения роли ренин-ангиотензиновой системы в регуляции сосудистого тонуса в организме в норме и при патологических состояниях. Получены также данные, свидетельствующие о перспективности применения этого пептида в раннем восстановительном периоде после клинической смерти для снижения постреанимационных осложнений [5]. В этом плане изучение взаимосвязи структуры и активности тепротида представляет не только теоретический, но и практический интерес.

Исследования, проведенные ранее [6], позволили выявить различную специфичность отдельных участков молекулы тепротида. Установлено, что для проявления ингибирующего действия тепротида необходимо наличие свободной карбоксильной группы. Введение вместо остатка аргинина в положении 4 основных аминокислот или глицина не вызывало заметной потери активности. Более существенным оказался остаток триптофана, так как его замена на остатки изолейцина или глицина уменьшала активность пептида в 3 и 6,5 раза соответственно. На основании данных об активности частичных последовательностей тепротида Фишер с сотр. [7] высказали

Сокращения: EEDQ — N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохиолин; OTer — 2,4,5-трихлорфенокси-; OPfp — пентафторфенокси-; DMF — диметилформамид, Glp — пироглутаминовая кислота.

Ингибирующая ( $I_{50}$ ) и брадикининпотенцирующая активность аналогов тепротида

| Соединение | Пептид *                            | $I_{50}^{2*}$ | Относительная<br>потенцирующая<br>активность $3^*$ , % |
|------------|-------------------------------------|---------------|--|
| (I)        | Glp-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro | 50            | 100  |
| (II)       | Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro | 150           | 115  |
| (III)      | Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro | 110           | 20   |
| (IV)       | Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro     | 220           | 70   |
| (V)        | Glp-Phe-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro | 60            | 80   |
| (VI)       | Glp-Trp-Pro-Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro | 350           | 80   |
| (VII)      | Glp-Trp-Pro-Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro | 550           | 30   |

\* Подчеркнут измененный по сравнению с тепротидом (I) аминокислотный остаток.

$2^*$   $I_{50}$  — концентрация пептида в пробе (нМ), при которой отмечается 50% торможения активности пептидилдипептидазы.

$3^*$  См. «Экспериментальную часть».

предположение об участии N-концевого фрагмента молекулы ингибитора, и особенно остатка триптофана, в связывании с ферментом.

Цель настоящей работы — дальнейшее изучение взаимосвязи структуры и биологической активности тепротида. Для этого нами был синтезирован ряд аналогов пептида (I), в которых были проведены замены различных аминокислот в N-концевой части молекулы (табл. 1).

Характерной структурной особенностью тепротида и других пептидных ингибиторов пептидилдипептидазы из ядов змей является наличие на N-конце молекулы пироглутаминовой кислоты. Однако до настоящего времени в литературе не приводится каких-либо сведений о влиянии замены этой кислоты на биологическую активность тепротида. Имеются только указания о некотором увеличении активности аналога, полученного заменой ее на циклопентилкарбоновую кислоту [6]. Для выяснения роли N-концевой пироглутаминовой кислоты нами были синтезированы аналоги (II) и (III) (см. табл. 1), в которых остаток этой кислоты был заменен на пролин и глутаминовую кислоту. Эти соединения могут также оказаться перспективными для получения специфических сорбентов для аффинной хроматографии пептидилдипептидазы, при проведении физико-химических исследований пространственной структуры тепротида и выяснении механизма его взаимодействия с пептидилдипептидазой. Кроме того, был синтезирован укороченный аналог (IV), des-Glp<sup>1</sup>-тепротид, и аналог тепротида, содержащий фенилаланин в положении 2 (соединение V), полученный ранее твердофазным методом [6].

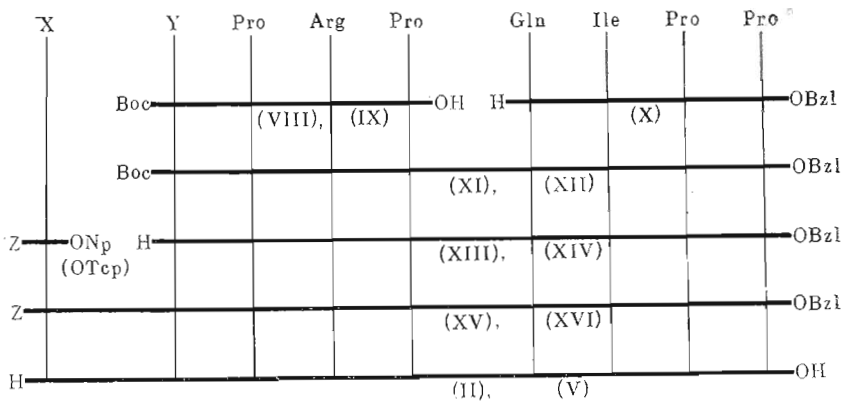
Известный интерес представляют модификации молекулы тепротида по остатку аргинина в положении 4 пептидной цепи. Теоретический конформационный расчет предлагает для тепротида квазициклическую структуру, стабилизированную ионным взаимодействием, в которое вовлечена гуанидиновая группа аргинина [8]. С целью выяснения роли этой группировки для проявления биологической активности тепротида нами были синтезированы аналоги, в которых остаток аргинина в положении 4 был заменен на лейцин (пептид (VI)) и фенилаланин (пептид (VII)).

Синтез нонапептидов (II) и (V) \* проводили классическим способом, аналогичным описанному для природного нонапептида (I) [10]: активированный эфир N-концевой аминокислоты присоединяли к октапептиду, полученному конденсацией тетрапептидных фрагментов (схема 1). Защищенные нонапептиды очищали на сефадексе LH-20, гидрировали над Pd-чернью и после очистки на биогеле P-2 и ионообменной смоле IRA-410 в OH<sup>-</sup>-форме получали свободные нонапептиды (II) и (V).

Синтез аналогов (VI) и (VII), не содержащих аргинина в пептидной цепи, проводили последовательным присоединением пентафторфениловых эфиров защищенных аминокислот к C-концевому тетрапептиду; выход на каждой стадии ~70%. Практически таким же по эффективности оказа-

\* Синтез нонапептида (III) описан ранее [9].

Схема 1



Y=Trp: (VIII), (XI), (XIII), (XV), (II) Y=Phe: (IX), (XII), (XIV), (XVI), (V) X=Pro: (XV), (II) X=Glp: (XVI), (V)

лось присоединение дипептидных фрагментов методом смешанных ангидридов с изобутилхлорформнатом или методом активированных эфиров (схема 2). Защищенные гекса-, гепта- и октапептиды, не содержавшие аргинина в пептидной цепи, после стандартных промывок были индивидуальны по результатам хроматографии в тонком слое. Защищенные нонапептиды (XXVIII) и (XXIX) очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле, гидрировали над Pd-чернью и после хроматографической очистки на силикагеле выделяли свободные пептиды (VI) и (VII). Чистота свободных пептидов контролировалась с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления.

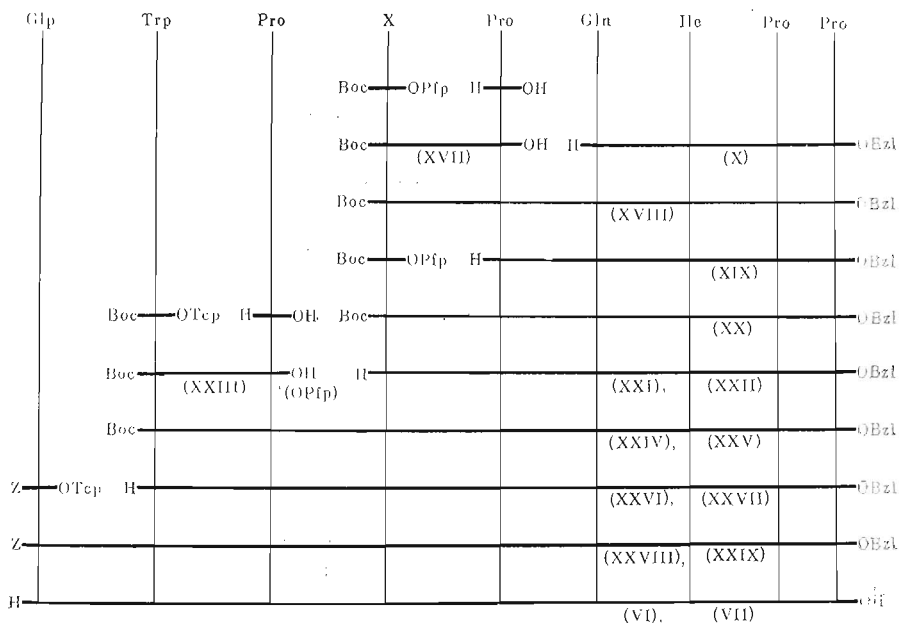
Для характеристики изменений пространственной структуры синтезированных аналогов по сравнению со структурой природного ингибитора были сняты спектры КД нонапептида (I) и его аналогов в области 190–300 нм. Спектры исследованных соединений обнаруживают отрицательный эффект Коттона при 200 нм, относимый к  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходам амидных групп, а также слабые положительные полосы при 220–240 нм, образованные перекрыванием полос  $n \rightarrow \pi^*$ -переходов амидных групп и полос ароматических хромофоров (рисунок). В области 250–300 нм также имеются слабые хироптические эффекты ароматических полос поглощения.

Детальное изучение пространственной структуры тепротида и его аналогов в растворах с помощью КД-спектроскопии будет опубликовано в последующих сообщениях. В этой статье для нас представляет интерес тот факт, что в исследованных нами условиях (изменение полярности растворителя и температуры от +20 до -100° C) в спектрах аналогов природного нонапептида (I) наблюдаются лишь незначительные изменения интенсивности эффектов Коттона. Так, замена триптофана на фенилаланин приводит к некоторому уменьшению эллиптичности при 225 нм и к увеличению ее зависимости от температуры (рисунок, в). Усиление температурной зависимости обусловлено, по-видимому, ослаблением гидробоных взаимодействий в популяции конформеров. Некоторое увеличение влияния температуры на величину эффекта Коттона для [Leu<sup>4</sup>]тепротида (VI) является, возможно, следствием отсутствия у аналога стабилизирующего ионного взаимодействия, включающего гуанидинную функцию аргинина в положении 4. Однако эти изменения невелики и связаны, по-видимому, с локальными перестройками пептидной молекулы.

Синтезированные аналоги были также охарактеризованы по их способности ингибировать высокоочищенные препараты пептидидипептидазы из почек быка и потенцировать действие брадикинина на изолированный отрезок подвздошной кишки морской свинки.

Измерение ингибирующей активности аналогов показало, что локальные конформационные изменения, проявляемые в спектрах КД, могут

Схема 2



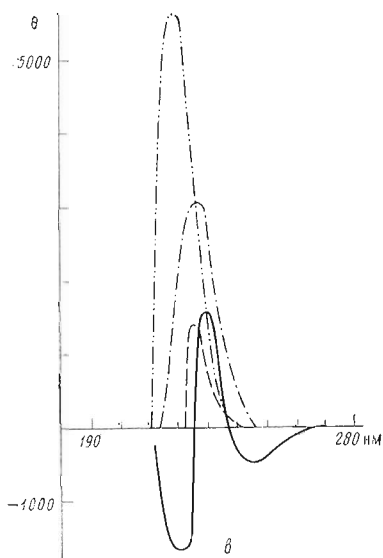
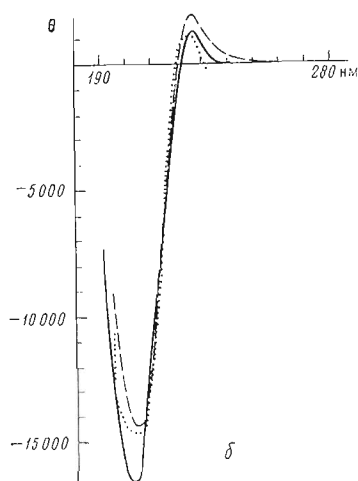
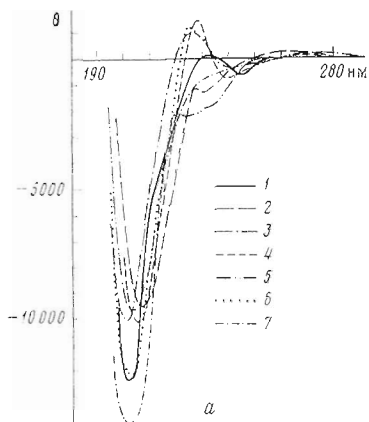
X=Leu: (XVII), (XVIII), (XXI), (XXIV), (XXVI), (XXVIII), (VI) X=Phe: (XX), (XXII), (XXV), (XXVII), (XXIX), (VII)

оказывать различное влияние на характер взаимодействия ингибиторов с пептидилдипептидазой, зависящее от положения модифицированного остатка. Фишером с сотр. [7] было высказано мнение, что пироглутаминовая кислота служит главным образом образом для защиты пептида от разрушения аминоклептидазами. Полученные нами данные свидетельствуют о наличии определенной роли у N-концевой аминокислоты ингибитора. Так, замена пироглутаминовой кислоты на пролин или глутаминовую кислоту приводит к снижению активности аналогов (II) и (III) в 3 и 2,4 раза соответственно, в то время как укорочение пептидной цепи на остаток пироглутаминовой кислоты снижает активность в 4,4 раза (табл. 1).

Наличие аргинина в положении 4 более существенно для ингибирующей активности пептида. Замена его на лейцин или фенилаланин снижает активность полученных аналогов в 7 или 11 раз соответственно (табл. 1). По-видимому, положительный заряд аргинина является существенным фактором, влияющим на ингибирующую активность тепротида. Замещение триптофана в положении 2 на фенилаланин практически не отразилось на активности.

При сопоставлении результатов определения  $I_{50}$  полученных аналогов тепротида и потенцирования ими действия брадикинина на гладкую мускулатуру обращает на себя внимание отсутствие параллелизма по этим показателям. Так, под влиянием [Pro<sup>1</sup>]тепротид (II) происходит не снижение, как при ингибировании, а некоторое усиление брадикининопотенцирующего действия по сравнению с природным пептидом. Если аналог (VII), содержащий фенилаланин в положении 4, тормозит активность пептидилдипептидазы в 11 раз слабее, чем сам тепротид, то его потенцирующий эффект снижается только в 3,3 раза. Пептид (VI), содержащий в положении 4 лейцин, сохраняет 80% потенцирующей активности, в то время как его ингибирующий эффект на пептидилдипептидазу составляет всего 14% активности природного ингибитора. Такое расхождение можно объяснить разными условиями постановки эксперимента при определении этих величин и различными способами оценки биологического действия ингибиторов (см. «Экспериментальную часть»).

В настоящее время большинство исследователей сходится на том, что основой брадикининопотенцирующего действия пептидных ингибиторов из ядов змей является торможение активности пептидилдипептидазы [11].



Спектры КД тепротида и его аналогов в этаноле при 20 (а) и  $-100^{\circ}\text{C}$  (б) и в воде (в). 1 — тепротид; 2 — [des-Glp<sup>1</sup>]тепротид (IV); 3 — [Leu<sup>4</sup>]тепротид (VI); 4 — [Phe<sup>4</sup>]тепротид (VII); 5 — [Phe<sup>2</sup>]тепротид (V); 6 — [Glu<sup>1</sup>]тепротид (III); 7 — [Pro<sup>1</sup>]тепротид (II)

Правда, имеются и другие представления о механизме брадикининпотенцирующего действия этих пептидов [12, 13]. В частности, высказывались предположения о влиянии этих пептидов на потенциал и проницаемость клеточных мембран [14–16], а также на взаимодействие брадикинина с его рецепторами [17]. Однако эти точки зрения не получили до настоящего времени убедительных экспериментальных доказательств.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что для проявления биологической активности тепротида существенное значение имеет положительный заряд аминокислотного остатка в положении 4, участвующего, по-видимому, в стабилизации пространственной структуры ингибитора путем ионного взаимодействия с С-концевой карбоксильной группой. Замена триптофана в положении 2 на остаток ароматической аминокислоты не влияет на биологическую активность ингибитора. Наличие заряда на N-конце пептидной цепи снижает тормозящее действие аналогов тепротида на пептидилдипептидазу.

### Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты и их производные фирм Reanal и Serva. Индивидуальность полученных соединений проверяли ТСХ на пластинках (Merck, Silica gel 60F<sub>254</sub>) в системах *n*-бутанол — уксусная

кислота — вода, 13:2:5 (А) и 5:3:2 (Б), *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 5:5:1:3 (В), хлороформ — метанол, 9:1 (Г), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 8:1:1 (Д) и электрофорезом на бумаге FN-17 в горизонтальном приборе при градиенте потенциала 24 В·см<sup>-1</sup> в 1 М ацетатном (рН 2,4) и пиридин-ацетатном буфере (рН 5,5). Колонночную хроматографию проводили на силикагеле L 40—100 мкм (Chemapol, СССР). Температуры плавления (не исправлены) определяли на нагревательном столике Voëtius (ГДР). Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 241 (США); спектры КД регистрировали на приборе Roussel-Jouan Dichrograph CD 185, Model II. Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных в запаянных ампулах 6 н. HCl при 110° С в течение 24 ч, выполняли на автоматическом анализаторе Bioscal BC201 (ФРГ). Содержание триптофана определяли спектрофотометрически [18]. ВЭЖХ проводили на смоле Lichrosorb RP-18 (10 мкм) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 2,1) на приборе фирмы Knauer (Зап. Берлин). Растворы веществ в органических растворителях высушивали над MgSO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме при температуре не выше 40° С. Выходы и константы полученных соединений приведены в табл. 2.

1. *Woc-Phe-Pro-Arg-Pro* (IX). К раствору 0,4 г (1,08 ммоль) *H-Pro-Arg-Pro-OH* [19] в смеси 13 мл DMF и 8 мл воды прибавляли 0,53 г (1,23 ммоль) *Woc-Phe-OPfr* и 0,15 мл (1,08 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 37° С, упаривали, приливали сухой эфир, выдерживали ~4 ч при 0° С и отфильтровывали. Получали 0,57 г тетрапептида (IX), который очищали пересаживанием из этилацетата эфиром.

2. *Woc-Phe-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (XII). К охлажденному до 0° С раствору 0,36 г (0,621 ммоль) *HCl·Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (X) [10] и 0,38 г (0,620 ммоль) тетрапептида (IX) в 4 мл свежеперегнанного сухого хлороформа прибавляли 0,16 г (0,65 ммоль) EFDQ, выдерживали 1 ч при этой температуре и оставляли на 20 ч при 20° С. Растворитель упаривали, добавляли сухой эфир и отфильтровывали 0,68 г защищенного октапептида (XII), который очищали гелевой фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле. *R<sub>f</sub>* 0,65 (Б), 0,21 (Г).

3. *HCl·Phe-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (XIV). К раствору 0,31 г (0,264 ммоль) защищенного октапептида (XII) в 1,5 мл CH<sub>3</sub>COOH приливали 1,5 мл 5 н. HCl в CH<sub>3</sub>COOH, выдерживали 35 мин при 20° С и упаривали. Остаток растирали с абсолютным эфиром и отфильтровывали 0,29 г октапептида (XIV).

4. *Z-Glp-Phe-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (XVI). К раствору 0,29 г (0,26 ммоль) октапептида (XIV) и 0,15 г (0,34 ммоль) *Z-Glp-OTcp* в 1 мл DMF приливали 0,09 мл (0,64 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 37° С, затем приливали 25 мл этилацетата, выдерживали несколько часов при 0° С и отфильтровывали 0,31 г защищенного нонапептида, который очищали гелевой фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле. *R<sub>f</sub>* 0,6 (Б), 0,26 (Д).

5. *Glp-Phe-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH* (V). 0,16 г защищенного нонапептида (XVI) гидрировали в метаноле над Pd-чернью в течение 6 ч. Отфильтровывали катализатор, растворитель упаривали, остаток пересаживали из метанола эфиром. Отфильтровывали 0,117 г нонапептида (V), который очищали на биогеде Р-2 в 2% уксусной кислоте, а затем растворяли в метаноле и пропускали через смолу IRA-410 в OH<sup>-</sup>-форме. *R<sub>f</sub>* 0,5 (Б). Аминокислотный анализ: Glu 1,98, Pro 4,02, Ile 1,02, Arg 0,97, Phe 1,02.

6. *Z-Pro-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (XV) получали в условиях опыта 4 из 0,2 г (0,173 ммоль) *HCl·Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (XIII) [10], 0,082 г (0,226 ммоль) *Z-Pro-ONp* и 0,062 мл (0,43 ммоль) триэтиламина: *R<sub>f</sub>* 0,5 (Б).

7. *H-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH* (II) получали в условиях опыта 5 из 0,1 г защищенного нонапептида (XV). *R<sub>f</sub>* 0,57 (Б). Аминокислотный анализ: Pro 4,97, Glu 1,06, Ile 0,95, Arg 1,02, Trp 0,99.

8. *Woc-Leu-Pro-OH* (XVII). К суспензии 0,1 г (0,87 ммоль) пролина в 3 мл хлороформа при 0° С прибавляли 0,12 мл (0,87 ммоль) триэтиламини-

## Характеристика синтезированных соединений

| №        | Соединение                                      | Брутто-формула  | Т. пл., °С | $[\alpha]_D$ ,<br>град<br>(с 1,<br>MeOH) | Вы-<br>ход, % |
|----------|---|---|------------|--|---------------|
| (II)     | Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH          | C <sub>53</sub> H <sub>77</sub> N <sub>14</sub> O <sub>11</sub>                 | 194–200    | –111,0                                   | 48            |
| (V)      | Glp-Phe-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH          | C <sub>51</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>                 | 215–216    | –113,0                                   | 53            |
| (VI)     | Glp-Trp-Pro-Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH          | C <sub>53</sub> H <sub>75</sub> N <sub>14</sub> O <sub>12</sub>                 | 232–235    | –131,1                                   | 60            |
| (VII)    | Glp-Trp-Pro-Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH          | C <sub>56</sub> H <sub>75</sub> N <sub>14</sub> O <sub>12</sub>                 | 182–183    | –124,0                                   | 65            |
| (IX)     | Boc-Phe-Pro-Arg-Pro-OH                          | C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>                   | 167–169    | –67,5                                    | 85            |
| (XII)    | Boc-Phe-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl   | C <sub>58</sub> H <sub>85</sub> N <sub>12</sub> O <sub>17</sub> Cl              | 157–160    | –129,5                                   | 41            |
| (XIV)    | HCl·Phe-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl   | C <sub>53</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> | 165–168    | –117,7                                   | 99            |
| (XV)     | Z-Pro-Trp-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl | C <sub>68</sub> H <sub>94</sub> N <sub>14</sub> O <sub>13</sub> Cl              | 153–156    | –155,8                                   | 62            |
| (XVI)    | Z-Glp-Phe-Pro-Arg(HCl)-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl | C <sub>66</sub> H <sub>88</sub> N <sub>13</sub> O <sub>14</sub> Cl              | 164–169    | –134,0                                   | 60            |
| (XVII)   | Boc-Leu-Pro-OH                                  | C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>                   | 44–46      | –92,4 *                                  | 94            |
| (XVIII)  | Boc-Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl                | C <sub>44</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>10</sub>                  | 60–64      | –146,3<br>–120,7 *                       | 74,5          |
| (XX)     | Boc-Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl                | C <sub>47</sub> H <sub>65</sub> N <sub>7</sub> O <sub>10</sub>                  | 92–112     | –120,5                                   | 68            |
| (XXI)    | HCl·Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl                | C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> Cl                | 170–171    | –138,0                                   | 91            |
| (XXII)   | HCl·Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl                | C <sub>42</sub> H <sub>58</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> Cl                | 130–140    | –113,8                                   | 94            |
| (XXIII)  | Boc-Trp-Pro-OH                                  | C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>                   | 120–122    | –17,2<br>–31,4 *                         | 91            |
| (XXIV)   | Boc-Trp-Pro-Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl        | C <sub>60</sub> H <sub>84</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>                 | 125–127    | –149,5<br>–103,2 *                       | 55            |
| (XXV)    | Boc-Trp-Pro-Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl        | C <sub>63</sub> H <sub>82</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>                 | 126–135    | –110,0                                   | 88            |
| (XXVI)   | HCl·Trp-Pro-Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl        | C <sub>55</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> Cl              | 165–169    | –131,0                                   | ~100          |
| (XXVII)  | HCl·Trp-Pro-Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl        | C <sub>58</sub> H <sub>75</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> Cl              | 184–185    | –112,3                                   | 94            |
| (XXVIII) | Z-Glp-Trp-Pro-Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl      | C <sub>68</sub> H <sub>87</sub> N <sub>11</sub> O <sub>14</sub>                 | 137–140    | –153,3                                   | 58            |
| (XXIX)   | Z-Glp-Trp-Pro-Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl      | C <sub>71</sub> H <sub>85</sub> N <sub>11</sub> O <sub>14</sub>                 | 145–150    | –120,5                                   | 45            |

\* с 1, хлороформ.

на, 0,32 г (0,78 ммоль) Boc-Leu-OPfр и еще 0,12 мл (0,87 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали 16–20 ч при 20° С, упаривали растворитель и оставшееся масло растворяли в этилацетате. Отфильтровывали нерастворившийся осадок, фильтрат промывали водой и водный раствор подкисляли при 2° С 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до pH 3–4. Экстрагировали этилацетатом, этилацетатный раствор промывали водой, сушили, упаривали и получали динептид (XVII) в виде аморфного порошка, R<sub>f</sub> 0,4 (Г), 0,23 (хлороформ – этилацетат, 7 : 3).

9. Boc-Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl (XVIII). К раствору 0,12 г (0,38 ммоль) дипептида (XVII) в 3 мл свежеперегнанного сухого хлороформа при –15° С прибавляли 0,053 мл (0,38 ммоль) триэтиламина и 0,05 мл (0,38 ммоль) изобутилового эфира хлоругольной кислоты, перемешивали при этой температуре 20 мин и добавляли охлажденный до –15° С раствор 0,22 г (0,38 ммоль) HCl·Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl (X) и 0,05 мл (0,38 ммоль) триэтиламина в 3 мл хлороформа. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С и 3 ч при 20° С, растворитель упаривали. Остаток

растворяли в этилацетате, промывали водой, 8%  $\text{NaHCO}_3$ , водой, 10% лимонной кислотой, водой, сушили, упаривали несколько раз с сухим эфиром и получали 0,24 г гексапептида (XVIII) в виде аморфного вещества:  $R_f$  0,38 (Г), 0,43 (Д).

10. *Boc-Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (XX). К охлажденному до  $0^\circ\text{C}$  раствору 0,52 г (0,77 ммоль)  $\text{HCl}\cdot\text{Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl}$  (XIX) [10] и 0,315 г (0,73 ммоль) *Boc-Phe-OPfp* в 2,5 мл DMF приливали при перемешивании 0,107 мл (0,77 ммоль) триэтиламина, а через 15 мин добавляли еще несколько капель триэтиламина для поддержания pH реакционной смеси не ниже 8. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при  $0^\circ\text{C}$ , 20 ч при  $20^\circ\text{C}$ , фильтровали и упаривали с толуолом. Растворяли в 20 мл этилацетата, промывали водой, 8%  $\text{NaHCO}_3$ , водой, 10% лимонной кислотой, водой, сушили, упаривали и остаток пересаждали эфиром из этилацетата. Получали 0,44 г хроматографически индивидуального защищенного гексапептида (XX).  $R_f$  0,37 (Г), 0,4 (Д).

11. *Boc-Trp-Pro-OH* (XXIII) получали в условиях опыта 8 из 0,1 г (0,87 ммоль) *H-Pro-OH*, 0,36 г (0,78 ммоль) *Boc-Trp-OTcp* и 0,24 мл (1,74 ммоль) триэтиламина в 3 мл хлороформа.

12. *Boc-Trp-Pro-Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (XXIV). К раствору 0,086 г (0,214 ммоль) дипептида (XXIII) в 3 мл свежеперегнанного сухого хлороформа при  $-20^\circ\text{C}$  прибавляли 0,03 мл (0,214 ммоль) триэтиламина и 0,028 мл (0,214 ммоль) изобутилового эфира хлоругольной кислоты. Перемешивали 20 мин при этой температуре и приливали охлажденный до  $-20^\circ\text{C}$  раствор 0,166 г (0,214 ммоль) хлоридрата гексапептида (XXI), полученного из защищенного гексапептида (XVIII) в условиях опыта 3, и 0,03 мл (0,214 ммоль) триэтиламина в 3 мл хлороформа. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при  $0^\circ\text{C}$ , 3 ч при  $20^\circ\text{C}$  и обрабатывали в условиях опыта 9. Остаток растирали с эфиром и получали 0,15 г октапептида (XXIV).  $R_f$  0,58 (А), 0,7 (Б), 0,31 (Г).

13. *Boc-Trp-Pro-Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (XXV). Из 0,19 г (0,23 ммоль) хлоридрата гексапептида (XXII), полученного из защищенного гексапептида (XX) в условиях опыта 3, и 0,145 г (0,25 ммоль) *Boc-Trp-Pro-OPfp*, синтезированного с выходом 93% из дипептида (XXIII) и пентафторфенола карбодимидным методом в этилацетате [20], в условиях опыта 10 получали 0,24 г хроматографически индивидуального октапептида (XXV).  $R_f$  0,6 (А), 0,32 (Г).

14. *Z-Glp-Trp-Pro-Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (XXVIII). К раствору 0,1 г (0,093 ммоль) октапептида (XXVI), полученного из октапептида (XXIV) в условиях опыта 3 в присутствии анизола, и 0,053 г (0,12 ммоль) *Z-Glp-OTcp* в 1 мл DMF прибавляли 0,003 мл (0,23 ммоль) триэтиламина, выдерживали 20 ч при  $37^\circ\text{C}$ , приливали 20 мл сухого эфира и отфильтровывали 0,11 г нонапептида (XXVIII), который очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле,  $R_f$  0,3 (А), 0,22 (Г).

15. *Z-Glp-Trp-Pro-Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl* (XXIX). К раствору 0,19 г (0,17 ммоль) хлоридрата октапептида (XXVII), полученного из октапептида (XXV) в условиях опыта 3 в присутствии анизола, и 0,086 г (0,19 ммоль) *Z-Glp-OTcp* в 1 мл DMF приливали 0,036 мл (0,25 ммоль) триэтиламина. Выдерживали 20 ч при  $37^\circ\text{C}$ , отфильтровывали, упаривали с толуолом и к остатку приливали этилацетат. Выпавший осадок отфильтровывали (0,11 г, 49%), этилацетатный раствор промывали водой, 8%  $\text{NaHCO}_3$ , водой, 1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , водой, сушили, упаривали, к остатку приливали сухой эфир и отфильтровывали еще 0,07 г (31%) нонапептида (XXIX), идентичного по ТСХ осадку, вынавшему из этилацетата. Защищенный нонапептид (XXIX) очищали на сефадексе LH-20 в метаноле.  $R_f$  0,4 (Б), 0,21 (Г).

16. *Glp-Trp-Pro-Leu-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH* (VI). 0,05 г нонапептида (XXVIII) гидрировали в условиях опыта 5 и свободный нонапептид очищали хроматографией на силикагеле с градиентной элюцией (хлороформ  $\rightarrow$  метанол — хлороформ, 1 : 3).  $R_f$  0,3 (А), 0,43 (Б). Аминокислотный анализ: Glu 1,99, Pro 4,02, Ile 1,05, Leu 0,976, Trp 0,97.

17. *Glp-Trp-Pro-Phe-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OH* (VII) получали из 0,07 г



защищенного нонапептида (XXIX) в условиях опыта 16.  $R_f$  0,6 (Б), 0,17 (Г). Аминокислотный анализ: Glu 2,01, Pro 3,98, Ile 1,02, Phe 1,03, Trp 0,97.

Ингибирующую активность тепротида и его аналогов выражали величиной  $I_{50}$ , которую определяли по торможению расщепления пептидилди-пептидазой, выделенной из почек быка, С-концевого трипептида (Z-Phe-His-Leu) ангиотензина I. Активность фермента определяли флуориметрическим методом [21]. Определение  $I_{50}$  для синтезированных пептидов проводили при пяти-шести концентрациях ингибитора (от  $10^{-5}$  до  $10^{-9}$  М) и концентрации субстрата  $5 \cdot 10^{-5}$  М. Количество фермента в опытах подбирали таким образом, чтобы степень гидролиза субстрата не превышала 10–15%.

Потенцирующее действие аналогов тепротида определяли на изолированном отрезке тонкого кишечника морской свинки. Препарат кишки помещали в баню с азированным раствором Тироде (рН 7,35) при 37° С. В качестве стандарта выбирали усредненную величину сокращения, полученную после многократного введения брадикинина в рабочей концентрации ( $1 \cdot 10^{-8}$  М) в раствор с изолированным отрезком кишки. Концентрация тепротида, равная  $1 \cdot 10^{-8}$  М, которая в условиях опыта вдвое увеличивала сокращение отрезка кишки, вызываемое рабочей концентрацией брадикинина, принята за 100%.

Авторы выражают благодарность Ivo Grič (Институт органической химии и биохимии, Прага, ЧССР) за помощь в снятии и интерпретации спектров КД.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Елисеева Ю. Е., Орехович В. Н., Павлухина Л. В., Алексеенко Л. П. *Вопр. мед. химии*, 1970, т. 16, № 16, с. 646–649.
2. Cushman D. W., Ondetti M. A. *Biochem. Pharmacol.*, 1980, v. 29, p. 1871–1877.
3. Case D. B., Wallace J. M., Keim H. J., Weber M. A., Sealey J. E., Laragh J. H. *New Engl. J. Med.*, 1977, v. 296, p. 641–646.
4. Vinci J. M., Horwitz D., Zusman R. M., Pisano J. J., Catt K. J., Keiser H. R. *Hypertension*, 1979, v. 1, p. 416–426.
5. Орехович В. Н., Елисеева Ю. Е., Павлухина Л. В., Пеговский В. А., Новодержкина И. С., Молчанова Л. В. *Докл. АН СССР*, 1980, т. 250, № 1, с. 253–256.
6. Cushman D. W., Pluščec J., Williams N. J., Weaver E. R., Sabo E. F., Kosy O., Cheung H. S., Ondetti M. A. *Experientia*, 1973, v. 29, № 8, p. 1032–1035.
7. Fisher G. H., Ryan J. M., Martin L. C., Pena G. A. *Adv. in Exp. Medicine and Biology. Kinins-II/Eds Fujii S., Moriya H., Suzuki T. N.* Y.—L.: Plenum Press, 1979, v. 120B, p. 651–663.
8. Севастьянова Н. И., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. *Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 4, с. 473–484.
9. Крит Н. А., Филатова М. П., Ковальчук О. В., Бесчастная Н. В. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 7, с. 965–970.
10. Филатова М. П., Крит Н. А., Ковальчук О. В., Комарова О. М., Рейссманн З. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 11, с. 1605–1614.
11. Cushman D. W., Ondetti M. A. *Progr. in Med. Chem.*, 1980, v. 17, p. 42–104.
12. Paegelow I., Reissmann S., Arold H. *Acta biol. et med. Germ.*, 1976, v. 35, N. 2, p. 235–244.
13. Tomimaga M., Stewart J. M., Paiva T. B., Paiva A. C. M. *J. Med. Chem.*, 1975, v. 18, № 2, p. 130–133.
14. Shimuta S. I., Sabia E. B., Paiva A. C. M. *Eur. J. Pharm.*, 1981, v. 70, p. 551–558.
15. Paegelow I., Reissmann S., Arold H. *Acta biol. et med. Germ.*, 1976, v. 35, K51–K56.
16. Aarsen P. N. *Brit. J. Pharm.*, 1977, v. 61, p. 523–532.
17. Ufkes J. G. R., Aarsen P. N., van der Meer C. *Eur. J. Pharm.*, 1977, v. 44, p. 89–97.
18. Wellaufer D. B. *Adv. in Protein Chem.* N. Y.—London: Acad. Press, 1962, v. 17, p. 375–380.
19. Равдель Г. А., Моисеева Н. Н., Крит Н. А., Филатова М. П., Лисункини Ю. И., Иванов В. Т. *Химия природ. соединений*, 1975, № 1, с. 47–56.
20. Kistalady L., Löw M., Nyéki O., Szirtes F., Schön I. *Lieb. Ann.*, 1973, № 9, S. 1421–1429.
21. Елисеева Ю. Е., Орехович В. Н., Павлухина Л. В. *Вопр. мед. химии*, 1976, т. 22, № 1, с. 81–89.

Поступила в редакцию  
13. VI. 1984

**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANALOGUES OF PEPTIDYL  
DIPEPTIDASE NONAPEPTIDE INHIBITOR**

FILATOVA M. P., KRIT N. A., BESCHASTNAYA N. V., BLOKHINA A. V.,  
KOZLOVA N. I., PAVLIKHINA L. V., ELISEEVA Yu. E., OREKHOVICH V. N.,  
REISSMANN S\*, PEGELOW I.\*\*

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical  
Sciences of the USSR, Moscow; \*P. Schiller University, Iena;*  
*\*\*Institute of Pharmacology and Toxicology, W. Piek University, Rostok*

The synthesis of 5 analogues of the effective inhibitor of peptidyl dipeptidase, teprotide, has been carried out. The inhibitory and bradykinin-potentiating activity of these compounds has been assayed. N-Terminal pyroglutamic acid and positive charge of arginine in position 4 were found to be essential for biological activity of the inhibitor.