



УДК 547.962.07

ПОБОЧНЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ СИНТЕЗЕ ПИРОГЛУТАМИЛПЕПТИДОВ

*Крит Н. А., Филатова М. П., Ковальчук О. В.,
Бесчастная Н. В.*

*Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Сочетанием химических и аналитических методов, а также встречным синтезом установлено, что при получении пептидного ингибитора пептидилдипептидазы последовательности $\angle\text{Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro}$ происходит побочная реакция раскрытия пирролидинового кольца пироглутаминовой кислоты. На модельных опытах исследованы условия взаимопревращения пироглутамил- и глутамилпептидов различной длины.

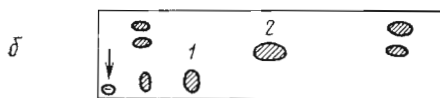
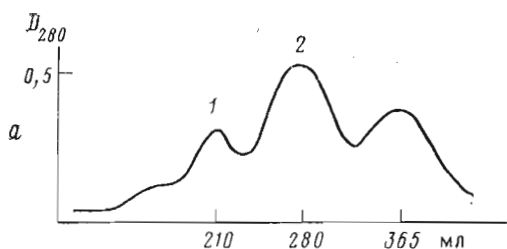
В настоящее время известно большое число биологически активных пироглутамилпептидов, выполняющих различные ответственные функции в организме. Так как все возрастающая потребность в этих соединениях удовлетворяется в основном за счет синтетических препаратов, несомненный интерес представляет разработка оптимальных условий синтеза пироглутамилпептидов, позволяющих избежать образования нежелательных побочных продуктов.

В связи с этим целесообразно привести данные об условиях протекания побочного раскрытия пирролидинового кольца пироглутаминовой кислоты, полученные в ходе синтеза пептидного ингибитора (1) пептидилдипептидазы SQ 20881 [1]



Так, нами было обнаружено, что при конденсации $Z-\angle\text{Glu-Trp-Pro-ONr}$ с бензиловым эфиром гексапептида $\text{Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro}$ или $Z-\angle\text{Glu-Trp-Pro-Arg-Pro}$ с бензиловым эфиром тетрапептида Gln-Ile-Pro-Pro с помощью N,N' -дициклогексилкарбодиимида как в присутствии, так и в отсутствие N -оксибензотриазола наряду с основным пептидом образовывался побочный продукт, который после гидрирования над Pd-чернью имел положительную реакцию с нингидрином. Нонапептид (1) и побочный продукт разделяли двукратной хроматографией на биогеле Р-2 в 2% уксусной кислоте (рисунок) или в виде защищенных производных этих соединений на силикагеле с градиентной элюцией хлороформ — 30% метанол в хлороформе.

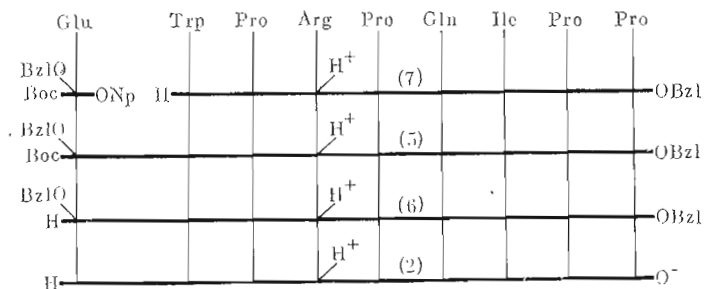
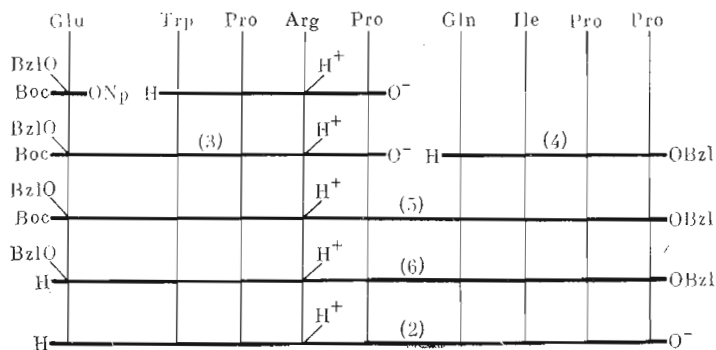
Все аналитические характеристики — хроматографическая и электрофоретическая подвижности и угол вращения побочного продукта, образующегося при синтезе нонапептида (1) тремя различными путями, совпадали, что указывало на идентичность этих соединений.



Разделение нонапептидов (1) и (2) на колонке (1,4×180 см) с биогеелем Р-2 в 2% уксусной кислоте (а) и электрофоретическая характеристика выделенных фракций в ацетатном буфере (рН 2,4), 24 В·см⁻¹ (б) (схематическое изображение):
1 — E_{HIS} 0,74; 2 — E_{HIS} 0,52

При исследовании нингидринположительного побочного продукта было обнаружено, что N-концевым остатком в нем является глутаминовая кислота, которая была идентифицирована в виде Dns-производного с использованием метода микротонкослойной хроматографии на силикагеле [2]. Последовательной деградацией побочного продукта с N-конца с помощью фенилизотиоцианата по методу Эдмана была установлена частичная N-концевая последовательность: Glu-Trp-Pro-Arg-Pro. Содержание Trp в пептиде было определено спектрофотометрически. Соотношение аминокислотных остатков, полученное на основании данных количественного аминокислотного анализа побочного продукта, оказалось таким же, как и в нонапептиде (1).

Исходя из вышеприведенных данных, было сделано предположение, что нингидринположительный продукт — аналог нонапептида (1), у которого N-концевым остатком является глутаминовая кислота. Для подтверждения этого предположения был осуществлен синтез Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro (2). Синтез этого пептида проводили двумя путями, представленными на схеме. Конденсацию пента- (3) и тетрапен-



тидного (4) фрагментов осуществляли в хлороформе с помощью N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина. Защищенный нонапептид очищали двукратной гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле. Второй метод синтеза нонапептида (2) состоял в присоединении *n*-нитрофенилового эфира *N*-*трет*-бутилоксикарбонил- γ -бензилоксиглутаминовой кислоты к октапептиду (7). Выходы защищенных нонапептидов, полученных двумя различными методами, после очистки были практически одинаковыми и составляли 35 и 32% соответственно. *трет*-Бутилоксикарбонильную группу снимали действием HCl в уксусной кислоте в присутствии анизола; бензиловые эфиры удаляли гидрированием в метаноле над Pd-чернью. Хлоргидрат свободного нонапептида (2) хроматографировали на колонке с биогелем P-2 в 2% уксусной кислоте; основание нонапептида (2) выделяли на смоле IRA-410 в OH⁻-форме.

Сравнение аналитических характеристик пептида (2) и нингидринположительного побочного продукта показало их полную идентичность. Таким образом, встречным синтезом было подтверждено, что это соединение представляет собой аналог нонапептида (1), в котором N-концевые остатки являются глутаминовая кислота, образовавшаяся, по-видимому, в результате раскрытия лактамного кольца пироглутаминовой кислоты.

Для выяснения границ устойчивости синтезированных пироглутамилпептидов было исследовано поведение нонапептида (1), N-концевых пироглутамилпептидов различной длины (8), (9) и соответствующих N-бензилоксикарбонилзащищенных пептидов (10)–(12) при действии реагентов, обычно используемых в белковой химии для раскрытия пирролидинового цикла в пироглутамилпептидах [3–7] (таблица). Эти исследования представляют, кроме того, самостоятельный интерес, например, для определения аминокислотной последовательности пироглутамилсодержащих пептидов.

Процесс контролировался электрофоретически и хроматографически по появлению соответствующего нингидринположительного продукта. Было обнаружено, что действие на свободные пептиды (8), (9) и (1) основных реагентов (17% раствора метиламина, аммиака, 1 и 2 н. NaOH) в течение 15–20 ч приводит к незначительному раскрытию пирролидинового кольца. Увеличение времени реакции до 5–7 сут не повышало полноту протекания реакции для всех исследованных пептидов. Проведенные опыты показали, что среди использованных методов селективным дей-

Раскрытие пирролидинового кольца пироглутамилпептидов при действии различных реагентов

Номер соединения	Соединение	17% раствор метиламина		NH ₃ конц.		1 и 2 н. NaOH		HCl/метанол	
		время	расщепление	время	расщепление	время	расщепление	время, сут	расщепление
(8)	<Glu-Trp	5–7 сут	Следы	5–7 сут.	Следы	5–7 сут.	Следы	1	Полное
(9)	<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro	5–7 »	»	5–7 »	»	5–7 »	»	1	
(1)	<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro	5–7 »	»	5–7 »	»	5–7 »	»	3–4	»
(10)	Z-<Glu-Trp	1–1,5 ч	Полное	10–12 ч	Полное	0,5–1 ч	Полное	1	»
(11)	Z-<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro	1–1,5 »	»	10–12 »	»	0,5–1 »	»	1	»
(12)	Z-<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl	1–1,5 »	»	10–12 »	»	0,5–1 »	»	1	»

тидного (4) фрагментов осуществляли в хлороформе с помощью N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохиолина. Защищенный нонапептид очищали двукратной геле-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле. Второй метод синтеза нонапептида (2) состоял в присоединении *n*-нитрофенилового эфира N-трет-бутилоксикарбонил-γ-бензилоксиглутаминовой кислоты к октапептиду (7). Выходы защищенных нонапептидов, полученных двумя различными методами, после очистки были практически одинаковыми и составляли 35 и 32% соответственно. трет-Бутилоксикарбонильную группу снимали действием HCl в уксусной кислоте в присутствии анизола; бензиловые эфиры удаляли гидрированием в метаноле над Pd-чернью. Хлоргидрат свободного нонапептида (2) хроматографировали на колонке с биогелем P-2 в 2% уксусной кислоте; основание нонапептида (2) выделяли на смоле IRA-410 в OH⁻-форме.

Сравнение аналитических характеристик пептида (2) и нингидринположительного побочного продукта показало их полную идентичность. Таким образом, встречным синтезом было подтверждено, что это соединение представляет собой аналог нонапептида (1), в котором N-концевым остатком является глутаминовая кислота, образовавшаяся, по-видимому, в результате раскрытия лактамного кольца пироглутаминовой кислоты.

Для выяснения границ устойчивости синтезированных пироглутамилпептидов было исследовано поведение нонапептида (1), N-концевых пироглутамилпептидов различной длины (8), (9) и соответствующих N-бензилоксикарбонилзащищенных пептидов (10)–(12) при действии реагентов, обычно используемых в белковой химии для раскрытия пирролидинового цикла в пироглутамилпептидах [3–7] (таблица). Эти исследования представляют, кроме того, самостоятельный интерес, например, для определения аминокислотной последовательности пироглутамилсодержащих пептидов.

Процесс контролировался электрофоретически и хроматографически по появлению соответствующего нингидринположительного продукта. Было обнаружено, что действие на свободные пептиды (8), (9) и (1) основных реагентов (17% раствора метиламина, аммиака, 1 и 2 н. NaOH) в течение 15–20 ч приводит к незначительному раскрытию пирролидинового кольца. Увеличение времени реакции до 5–7 сут не повышало полноту протекания реакции для всех исследованных пептидов. Проведенные опыты показали, что среди использованных методов селективным дей-

Раскрытие пирролидинового кольца пироглутамилпептидов при действии различных реагентов

Номер соединения	Соединение	17% раствор метиламина		NH ₃ конц.		1 и 2 н. NaOH		HCl/метанол	
		время	расщепление	время	расщепление	время	расщепление	время, сут	расщепление
(8)	<Glu-Trp	5–7 сут	Следы	5–7 сут.	Следы	5–7 сут.	Следы	1	Полное
(9)	<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro	5–7 »	»	5–7 »	»	5–7 »	»	1	»
(1)	<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro	5–7 »	»	5–7 »	»	5–7 »	»	3–4	»
(10)	Z-<Glu-Trp	1–1,5 ч	Полное	10–12 ч	Полное	0,5–1 ч	Полное	1	»
(11)	Z-<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro	1–1,5 »	»	10–12 »	»	0,5–1 »	»	1	»
(12)	Z-<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl	1–1,5 »	»	10–12 »	»	0,5–1 »	»	1	»

ствием обладает лишь метиламин, так как в остальных случаях наблюдались следы дополнительного расщепления пептидов.

Известно, что присутствие ароматических аминокислот, в частности фенилаланина и тирозина, замедляет гидролиз соседних с ними как пептидных, так и сложноэфирных связей [8–10]. Аналогичное влияние эти аминокислоты оказывают и при ферментативном воздействии на пироглутамилпептиды [11]. Обнаруженная нами низкая реакционная способность пиролидинового цикла пироглутаминовой кислоты в исследованных пептидах, по-видимому, также объясняется экранирующим действием соседнего остатка триптофана; ранее [6] было отмечено подобное влияние на расщепляемость пироглутаминовой кислоты соседнего остатка тирозина.

Несколько иная картина наблюдалась при действии на исследованные выше пироглутамилпептиды (8), (9) и (1) кислых реагентов, например раствора соляной кислоты в метаноле. В этом случае для ди- (8) и пента- (9) пептидов уже за 1 сут проходило полное раскрытие пиролидинового кольца, в то же время для нонапептида (1) полное исчезновение исходного пептида наблюдалось за 3–4 сут. Найденная здесь зависимость скорости реакции от длины пептидной цепи свидетельствует, по нашему мнению, о том, что в определенных условиях течение реакции может определяться не только природой соседнего остатка, но и конформацией молекулы в целом.

Аналогичные исследования, проведенные с соответствующими N-бензилоксикарбонилпептидами (10)–(12), показали значительно бóльшую лабильность этих соединений, что согласуется и с литературными данными [7, 12]. Кроме того, было обнаружено, что в отличие от незащищенных пептидов (8), (9) и (1) раскрытие пиролидинового кольца у N-ацилированных пироглутамилпептидов происходит с большей легкостью при действии основных реагентов. Так, соединения (10)–(12) за 1–1,5 ч полностью превращались в соответствующие N-бензилоксикарбонилглутамилпептиды в присутствии метиламина, тогда как при действии раствора соляной кислоты в метаноле за то же время реакция раскрытия пиролидинового кольца заканчивалась только через 1 сут. Однако при выдерживании соединений (10)–(12) в метанольном растворе в течение нескольких суток нами не было отмечено никаких признаков раскрытия цикла пироглутаминовой кислоты в отличие от Курата [13], обнаружившего неустойчивость N-бензилоксикарбонилпироглутамил-гистидил-пролиламида в аналогичных условиях. Все исследованные пироглутамилпептиды, как N-ацилированные, так и в виде свободных оснований, оказались устойчивыми во всех системах, использованных нами для выделения и очистки промежуточных и конечных продуктов.

Известно, что превращение пироглутамилпептидов в соответствующие глутамилпептиды является обратимой реакцией. Мы показали, что нонапептид (2) можно полностью перевести в соответствующий пироглутамилнонапептид (1), выдерживая его в смеси уксусной кислоты и уксусного ангидрида в течение 5–6 ч [14], в то же время в растворе уксусной кислоты это соединение, как и его эфир (6), оказалось вполне устойчивым. Напротив, в присутствии триэтиламина (pH 8–9) [13] пептид (6) полностью превращался в соединение (1) за 15–20 ч при комнатной температуре, тогда как нонапептид (2), имеющий свободную γ -карбоксыльную группу, давал в этих условиях лишь незначительную примесь пироглутамилпептида (1).

Таким образом, тот факт, что взаимопревращения глутамил- и пироглутамилпептидов могут протекать в мягких условиях, свидетельствует о необходимости тщательного контроля при выборе условий выделения и очистки этих пептидов, а также методов удаления защитных групп для предотвращения образования нежелательных побочных продуктов.

Кроме того, ранее [1] нами было отмечено влияние метода введения

тидного (4) фрагментов осуществляли в хлороформе с помощью *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина. Защищенный нонапептид очищали двукратной гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле. Второй метод синтеза нонапептида (2) состоял в присоединении *n*-нитрофенилового эфира *N*-трет-бутилоксикарбонил- γ -бензилоксиглутаминовой кислоты к октапептиду (7). Выходы защищенных нонапептидов, полученных двумя различными методами, после очистки были практически одинаковыми и составляли 35 и 32% соответственно. трет-Бутилоксикарбонильную группу снимали действием HCl в уксусной кислоте в присутствии анизола; бензиловые эфиры удаляли гидрированием в метаноле над Pd-чернью. Хлоргидрат свободного нонапептида (2) хроматографировали на колонке с биогелем P-2 в 2% уксусной кислоте; основание нонапептида (2) выделяли на смоле IRA-410 в OH⁻-форме.

Сравнение аналитических характеристик пептида (2) и нингидринположительного побочного продукта показало их полную идентичность. Таким образом, встречным синтезом было подтверждено, что это соединение представляет собой аналог нонапептида (1), в котором *N*-концевым остатком является глутаминовая кислота, образовавшаяся, по-видимому, в результате раскрытия лактамного кольца пироглутаминовой кислоты.

Для выяснения границ устойчивости синтезированных пироглутамилпептидов было исследовано поведение нонапептида (1), *N*-концевых пироглутамилпептидов различной длины (8), (9) и соответствующих *N*-бензилоксикарбонилзащищенных пептидов (10)–(12) при действии реагентов, обычно используемых в белковой химии для раскрытия пирролидинового цикла в пироглутамилпептидах [3–7] (таблица). Эти исследования представляют, кроме того, самостоятельный интерес, например, для определения аминокислотной последовательности пироглутамилсодержащих пептидов.

Процесс контролировался электрофоретически и хроматографически по появлению соответствующего нингидринположительного продукта. Было обнаружено, что действие на свободные пептиды (8), (9) и (1) основных реагентов (17% раствора метиламина, аммиака, 1 и 2 н. NaOH) в течение 15–20 ч приводит к незначительному раскрытию пирролидинового кольца. Увеличение времени реакции до 5–7 сут не повышало полноту протекания реакции для всех исследованных пептидов. Проведенные опыты показали, что среди использованных методов селективным дей-

Раскрытие пирролидинового кольца пироглутамилпептидов при действии различных реагентов

Номер соединения	Соединение	17% раствор метиламина		NH ₃ конц.		1 и 2 н. NaOH		HCl/метанол	
		время	расщепление	время	расщепление	время	расщепление	время, сут	расщепление
(8)	<Glu-Trp	5–7 сут	Следы	5–7 сут.	Следы	5–7 сут.	Следы	1	Полное
(9)	<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro	5–7 »	»	5–7 »	»	5–7 »	»	1	»
(1)	<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro	5–7 »	»	5–7 »	»	5–7 »	»	3–4	»
(10)	Z-<Glu-Trp	1–1,5 ч	Полное	10–12 ч	Полное	0,5–1 ч	Полное	1	»
(11)	Z-<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro	1–1,5 »	»	10–12 »	»	0,5–1 »	»	1	»
(12)	Z-<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro-OBzl	1–1,5 »	»	10–12 »	»	0,5–1 »	»	1	»

ствием обладает лишь метиламин, так как в остальных случаях наблюдались следы дополнительного расщепления пептидов.

Известно, что присутствие ароматических аминокислот, в частности фенилаланина и тирозина, замедляет гидролиз соседних с ними как пептидных, так и сложноэфирных связей [8—10]. Аналогичное влияние эти аминокислоты оказывают и при ферментативном воздействии на пироглутамилпептиды [11]. Обнаруженная нами низкая реакционная способность пирролидинового цикла пироглутаминовой кислоты в исследованных пептидах, по-видимому, также объясняется экранирующим действием соседнего остатка триптофана; ранее [6] было отмечено подобное влияние на расщепляемость пироглутаминовой кислоты соседнего остатка тирозина.

Несколько иная картина наблюдалась при действии на исследованные выше пироглутамилпептиды (8), (9) и (1) кислых реагентов, например раствора соляной кислоты в метаноле. В этом случае для ди- (8) и пента- (9) пептидов уже за 1 сут проходило полное раскрытие пирролидинового кольца, в то же время для нонапептида (1) полное исчезновение исходного пептида наблюдалось за 3—4 сут. Найденная здесь зависимость скорости реакции от длины пептидной цепи свидетельствует, по нашему мнению, о том, что в определенных условиях течение реакции может определяться не только природой соседнего остатка, но и конформацией молекулы в целом.

Аналогичные исследования, проведенные с соответствующими N-бензилоксикарбонилпептидами (10)—(12), показали значительно большую лабильность этих соединений, что согласуется и с литературными данными [7, 12]. Кроме того, было обнаружено, что в отличие от незащищенных пептидов (8), (9) и (1) раскрытие пирролидинового кольца у N-ацилированных пироглутамилпептидов происходит с большей легкостью при действии основных реагентов. Так, соединения (10)—(12) за 1—1,5 ч полностью превращались в соответствующие N-бензилоксикарбонилглутамилпептиды в присутствии метиламина, тогда как при действии раствора соляной кислоты в метаноле за то же время реакция раскрытия пирролидинового кольца заканчивалась только через 1 сут. Однако при выдерживании соединений (10)—(12) в метанольном растворе в течение нескольких суток нами не было отмечено никаких признаков раскрытия цикла пироглутаминовой кислоты в отличие от Курата [13], обнаружившего неустойчивость N-бензилоксикарбонилпироглутамил-гистидил-пролламида в аналогичных условиях. Все исследованные пироглутамилпептиды, как N-ацилированные, так и в виде свободных оснований, оказались устойчивыми во всех системах, использованных нами для выделения и очистки промежуточных и конечных продуктов.

Известно, что превращение пироглутамилпептидов в соответствующие глутамилпептиды является обратимой реакцией. Мы показали, что нонапептид (2) можно полностью перевести в соответствующий пироглутамилнонапептид (1), выдерживая его в смеси уксусной кислоты и уксусного ангидрида в течение 5—6 ч [14], в то же время в растворе уксусной кислоты это соединение, как и его эфир (6), оказалось вполне устойчивым. Напротив, в присутствии триэтиламина (рН 8—9) [13] пептид (6) полностью превращался в соединение (1) за 15—20 ч при комнатной температуре, тогда как нонапептид (2), имеющий свободную γ -карбоксильную группу, давал в этих условиях лишь незначительную примесь пироглутамилпептида (1).

Таким образом, тот факт, что взаимопревращения глутамил- и пироглутамилпептидов могут протекать в мягких условиях, свидетельствует о необходимости тщательного контроля при выборе условий выделения и очистки этих пептидов, а также методов удаления защитных групп для предотвращения образования нежелательных побочных продуктов.

Кроме того, ранее [1] нами было отмечено влияние метода введения

фрагмента, содержащего пироглутаминовую кислоту, на степень раскрытия пирролидинового кольца, что следует учитывать при разработке стратегии синтеза пироглутамилпептидов. По нашим данным, лучшие результаты получаются при введении пироглутамильного остатка на последней стадии построения пептидной цепи.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определены в открытом капилляре и приведены без исправления. Индивидуальность полученных соединений проверяли хроматографией в тонком слое на пластинках (Merck, Silica gel F₂₅₄) в системах *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (5 : 2 : 3) и *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (5 : 5 : 1 : 3) 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). Оптическое вращение определяли на поляриметре «Perkin Elmer», модель 241 (США). Пептиды гидролизовали 24 ч в запаянных ампулах 6 н. HCl при 110° С. Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе «Biocal BC-201» (ФРГ). Данные элементного анализа синтезированных соединений соответствовали вычисленным.

N^α-трет-Бутилоксикарбонил-γ-бензилоксиглутамил-триптофил-пролил-аргинил-пролин (3). К раствору 0,4 г триптофил-пролил-аргинил-пролина [1] в 7 мл воды приливали раствор 0,42 г *n*-нитрофенилового эфира трет-бутилоксикарбонил-γ-бензилоксиглутаминовой кислоты в 14 мл диоксана, выдерживали 30 мин при 40° С, упаривали досуха, остаток растворяли в 2 мл диметилформамида и оставляли на 18 ч при 37° С. К реакционному раствору приливали 50 мл сухого эфира и отфильтровывали 0,57 г (90%) пентапептида (3). Полученное соединение повторно пересаждали из диметилформамида эфиром, т.пл. 110–114° С, $[\alpha]_D^{20}$ –60,3° (с 1, метанол).

Хлоридрат бензилового эфира N^α-трет-бутилоксикарбонил-γ-бензилоксиглутамил-триптофил-пролил-аргинил-пролил-глутаминил-изолейцил-пролил-пролина (5). а) К раствору 0,21 г хлоридрата бензилового эфира глутаминил-изолейцил-пролил-пролина (4) [1] и 0,31 г пентапептида (3) в 1,5 мл сухого хлороформа прибавляли 0,1 г *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина и оставляли на 18 ч при 18–20° С. Продукт реакции (0,49 г) высаживали избытком сухого эфира, очищали двукратной гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле и получали 0,18 г (35%) чистого защищенного нонапептида (5), т.пл. 139–150° С, $[\alpha]_D^{20}$ –132,0° (с 0,5, метанол).

б) К раствору 0,23 г хлоридрата октапептида (7) [1] в 1 мл диметилформамида приливали 0,03 мл триэтиламина и прибавляли 0,12 г *n*-нитрофенилового эфира *N^α-трет-бутилоксикарбонил-γ-бензилоксиглутаминовой кислоты*, выдерживали 20 ч при 37° С. Продукт реакции (0,26 г) высаживали избытком сухого эфира, очищали двукратной гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 в метаноле и получали 0,092 г (32%) чистого защищенного нонапептида (5), т.пл. 140–149° С, $[\alpha]_D^{20}$ –132,4° (с 0,5, метанол).

Хлоридрат бензилового эфира γ-бензилоксиглутамил-триптофил-пролил-аргинил-пролил-глутаминил-изолейцил-пролил-пролина (6). К раствору 0,08 г защищенного нонапептида (5) в 0,4 мл уксусной кислоты приливали 0,1 мл анизола и 0,8 мл 4 н. HCl в уксусной кислоте, выдерживали 40 мин при 18–20° С, упаривали и остаток пересаждали из метанола сухим эфиром. Получали 0,068 г (89%) нонапептида (6), т.пл. 168–180° С, $[\alpha]_D^{20}$ –102,0° (с 0,5, метанол).

Глутамил-триптофил-пролил-аргинил-пролил-глутаминил-изолейцил-пролил-пролин (2). Частично защищенный нонапептид (6) (0,068 г)

гидрировали в метаноле над Pd-чернью в течение 6 ч. Катализатор отфильтровывали, растворитель отгоняли в вакууме и остаток переосаждали из метанола сухим эфиром. Хлоргидрат нонапептида (2) (0,059 г, 98,5%) отфильтровывали, очищали хроматографией на биогеле Р-2 в 2% уксусной кислоте и получали 0,039 г (65%) хроматографически индивидуального нонапептида. Полученное соединение в растворе метанола пропускали через 2 мл смолы IRA-410 в OH⁻-форме, упаривали, остаток переосаждали из метанола сухим эфиром и получали 0,032 г свободного нонапептида (2), т.пл. 250–260° С, $[\alpha]_D^{20} -129,4^\circ$ (с 0,5, 0,2 М уксусная кислота).

ЛИТЕРАТУРА

1. Филатова М. П., Криг Н. А., Ковальчук О. В., Комарова О. М., Рейссманн Э. Синтез девятичленного пептидного ингибитора пептидилпептидазы. — Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1605–1614.
2. Велевский В. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. Экспрессный ультрачувствительный метод идентификации N-концевых аминокислот в белках и пептидах с помощью тонкослойной хроматографии. — Докл. АН СССР, 1967, т. 172, № 1, с. 91–93.
3. Dekker C. A., Stone D., Fruton J. S. A peptide from a marine alga. — J. Biol. Chem., 1949, v. 181, № 2, p. 719–729.
4. Ikenaka T., Schmid K. A method for the isolation of pyroglutamyl peptides from glycoproteins. — Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1965, v. 120, № 3, p. 749–750.
5. Kawasaki I., Itano H. A. Methanolysis of the pyrrolidone ring of amino-terminal pyroglutamic acid in model peptides. — Anal. Biochem., 1972, v. 48, № 2, p. 546–556.
6. Муранова Т. А., Муранов А. В. Использование метиламина для раскрытия пирролидонового кольца N-концевого пироглутамила в пептидах. — Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 7, с. 1007–1010.
7. Klieger E., Gibian H. Weitere Synthesen von Glutamylpeptiden mit Carbobenzoxy-L-Pyroglutamylsäure. — Lieb. Ann., 1961, Bd 649, S. 183–202.
8. Muramatu M., Hirohata R., Kanda J., Shibuya S., Fujii S., Nagamatsu A., Ono T. Über die Hydrolysegeschwindigkeit bei der Säurespaltung von Dipeptiden. II. — H.-S. Z. Physiol. Chem., 1963, Bd 332, S. 256–262.
9. Muramatu M., Hirohata R., Kanda J., Shibuya S. Über die Hydrolysegeschwindigkeit bei der Säurespaltung von Dipeptiden. III. — H.-S. Z. Physiol. Chem., 1963, Bd 332, S. 263–270.
10. Филатова М. П. Депептидные аналоги брадикинина. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: Институт химии природных соединений АН СССР, 1968, 22 с.
11. Uliana J. A., Doolittle R. F. Pyrrolidonecarboxyl peptide: studies on the specificity of the enzyme. — Arch. Biochem. and Biophys., 1969, v. 131, № 2, p. 561–565.
12. Gibian H., Klieger E. Glutamylpeptid – Synthesen mit Carbobenzoxy-L-Pyroglutamylsäure. — Lieb. Ann., 1961, B. 640, S. 145–156.
13. Karath P., Thomas A. M. N-Carbobenzoxy-L-pyroglutamyl-L-histidyl peptides. — Helv. chim. acta, 1973, v. 56, № 5, p. 1656–1662.
14. Gillessen D., Felix A. M., Lergier W., Studer R. O. Synthese des «Thyrotropin-releasing» Hormons (TRH) (Schaf) und verwandter Peptide. — Helv. chim. acta, 1970, v. 53, № 1, p. 63–72.

Поступила в редакцию
5.I.1981

SIDE REACTIONS IN THE SYNTHESIS OF PYROGLUTAMYLPEPTIDES

KRIT N. A., FILATOVA M. P., KOVALCHUK O. V., BESCHASTNAYA N. V.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

The synthesis of nonapeptide inhibitor (SQ 20881) of peptidyl-dipeptidase is accompanied by a side reaction, the opening of pyrrolidone ring in pyroglutamic acid residue, as is shown by combination of chemical and analytical methods and the counter-synthesis of [Glu¹]-SQ 20881. The interconversion of glutamyl- and pyroglutamylpeptides of different length is studied in model experiments.