



УДК 577.175.85'.17

АТРИАЛЬНЫЕ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ

1. СИНТЕЗ С-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ

*Овчинников М. В., Беспалова Ж. Д., Молокеев А. С.,
Ревенко И. В., Сепетов Н. Ф., Исакова О. Л.,
Титов М. И.*

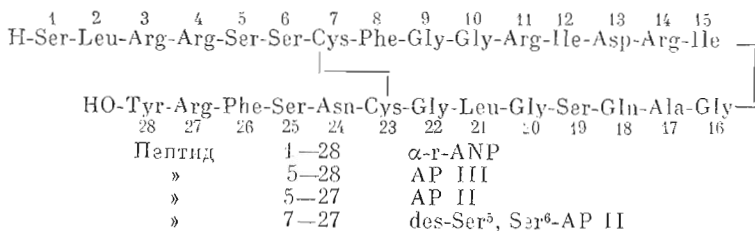
*Всесоюзный кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Классическими методами пептидной химии в растворе синтезированы пептиды, соответствующие С-концевой последовательности атриальных натрийуретических пептидов. Полученные пептиды охарактеризованы с помощью различных физико-химических методов. Обсуждается выбор схемы и методов синтеза.

В 1981 г. было показано [1], что введение экстрактов из предсердия крыс экспериментальным животным вызывает увеличение экскреции ионов натрия и воды. Открытие в предсердиях фактора, обладающего сильным натрийуретическим действием, положило начало многочисленным исследованиям, в результате которых было осуществлено выделение и установлена структура нескольких так называемых атриальных натрийуретических пептидов. К настоящему времени опубликован ряд обзоров и статей [2—5], посвященных обсуждению физиологических функций этих соединений. Предполагается, что ANP принимают участие в регуляции объема циркулирующей крови и в водно-солевом обмене [6]. Однако в литературе содержатся противоречивые данные о сравнительной активности различных ANP, также нет единого мнения о перспективах использования этих соединений в медицинской практике [7]. В связи с этим нами были начаты работы по химическому синтезу и изучению биологической роли ANP.

Подавляющее большинство синтезов этих соединений, описанных к настоящему времени в литературе, выполнено с использованием твердофазного метода [8—10]. Известен пример, когда фрагменты получали на полимерном носителе, а дальнейшие конденсации проводили методами классической пептидной химии в растворе [11]. Есть один пример синтеза с использованием методом классической пептидной химии в растворе [12]. Однако в этом кратком сообщении отсутствуют экспериментальные подробности проведения синтеза.

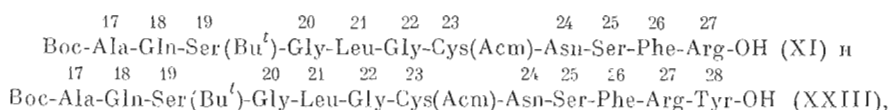
Начатая нами серия работ посвящена синтезу α -r-ANP — пептида с последовательностью 123—150 из предшественника ANP [1], а также трех его аналогов: AP II, AP III и des-Ser⁵, Ser⁶-AP II.



Сокращения: DMF — N,N-диметилформамид, DMSO — диметилсульфоксид, DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, HONB — N-гидроксн-5-норборнен-2,3-ди-карбоксимид, Pfp — пентафторфенил, «комплекс F» — кристаллический аддукт 1 моль DCC и 3 моль пентафторфенола, Np — n-нитрофенил, Acst — ацетамидометил, ANP — атриальные натрийуретические пептиды, α -r-ANP — атриальный натрийуретический пептид крысы, AP II — α -r-ANP-(5—27)-пептид, AP III — α -r-ANP-(5—28)-пептид.

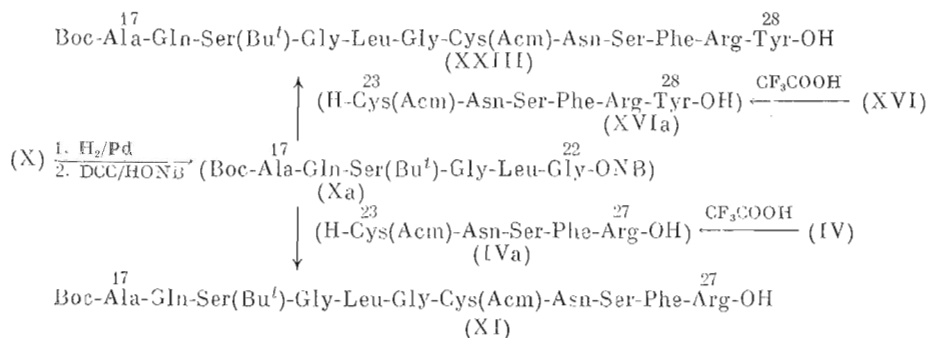
Стратегия синтеза вышеперечисленных пептидов была выбрана исходя из структурных особенностей этих соединений. Вся пептидная цепь α -r-ANP была разбита на пять примерно равных фрагментов: 1—6, 7—10; 11—16, 17—22 и 23—28. При этом особенно важно отметить, что, кроме фрагмента 1—6, все остальные активируемые во время синтеза фрагменты имеют на С-конце остатки оптически неактивного глицина. На последней стадии синтеза осуществляется конденсация двух больших фрагментов между остатками Gly¹⁶ и Ala¹⁷.

В настоящем сообщении мы описываем синтез двух С-концевых фрагментов α -r-ANP — 17—27 (XI) и 17—28 (XXIII):



являющихся общими для всех природных ANP, кроме α -r-ANP-(1—24)-пептида, оканчивающегося остатком Asn²⁴. Указанные пептиды в свою очередь получали конденсацией фрагмента 17—22 с фрагментом 23—27 или 23—28, как это представлено на схеме 1.

Схема 1



Для защиты боковых функций остатков тирозина и серина была использована *трет*-бутильная защита, α -аминогруппы защищались с помощью карбобензоксид- или *трет*-бутилоксикарбонильных групп. Сульфгидрильная группа цистеина вводилась в синтез в виде ацетамидометильного производного, а аргинин — в виде N ^{α} -Z, N ^{ω} -нитропроизводного или в виде свободного основания. Карбоксильные группы защищали с помощью бензиловых эфиров или солеобразования. Для создания пептидной связи использовали различные активированные эфиры.

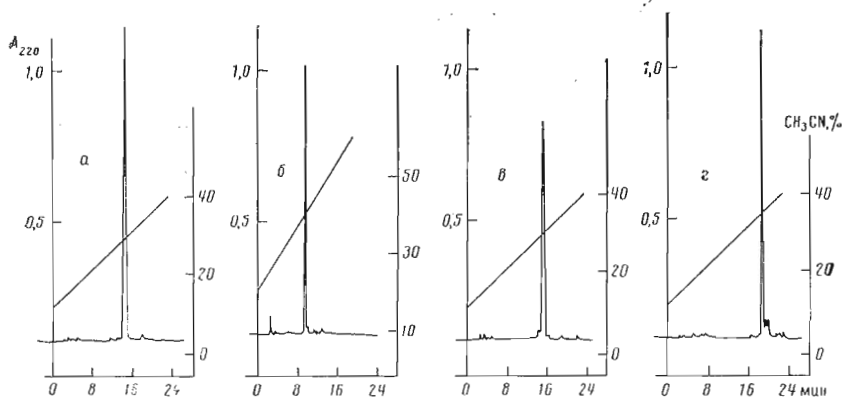
Синтез фрагмента 17—22 первоначально планировалось проводить путем последовательного наращивания пептидной цепи, начиная с остатка глицина и защищая карбоксильную функцию солеобразованием. Однако по мере увеличения длины цепи, с одной стороны, сильно ухудшалась растворимость пептида, а с другой — постепенно накапливались трудноотделимые примеси. Поэтому в дальнейшем было решено осуществлять синтез путем конденсации двух фрагментов: Boc-Ala-Gln-Ser(Bu^t)-Gly-OH (VIII) и H-Leu-Gly-OBzl (схема 2). Лучшие результаты были получены при использовании «комплекса F». Дипептид Boc-Leu-Gly-OBzl (IX) получали конденсацией *n*-нитрофенилового эфира *трет*-бутилоксикарбониллейцина с бензиловым эфиром глицина. Вос-защиту удаляли обработкой трифторуксусной кислотой, трифторацетат-ионы удаляли обработкой раствора пептида в водном изопропиловом спирте дауэксом в OH⁻-форме при —40° С. Защищенный тетрапептид Boc-Ala-Gln-Ser(Bu^t)-Gly-OH (VIII) синтезировали постепенным наращиванием пептидной цепи по одной аминокислоте, используя метод активированных эфиров. Карбоксильную группу глицина защищали солеобразованием. Таким образом был получен защищенный фрагмент 17—22 (X) (см. схему 2).

17 Ala	18 Gln	19 Ser	20 Gly	21 Leu	22 Gly
		Bu ^t			
		Z — ONB	H — O ⁻	Boc — ONp	H — OBzL
		Bu ^t	OH		
		Z — Bu ^t (VI)	O ⁻		
	Z — ONp	Bu ^t	OH		
	Z — (VII)	Bu ^t	O ⁻	Boc — (IX)	OBzL
Boc — ONSu	H — (VIII)	Bu ^t	OH	H —	OBzL
Boc —		Bu ^t	"КОМПЛЕКС"		OBzL
Boc —					

[illegible]

Синтез С-концевого гексапептида 23—28 был осуществлен несколькими путями (схема 3). Первоначально, исходя из аргинина в виде свободного основания, последовательным наращиванием пептидной цепи по одной аминокислоте был получен защищенный тетрапептид Boc-Asn-Ser(Bu^t)-Phe-Arg-OH (III), который далее вводили в синтез с ди-*tert*-бутиловым эфиром тирозина в присутствии дифенилфосфорилазида. После удаления защитных групп и хроматографии на колонке Lobar, Lichroprep RP-8 (Merck, ФРГ) с выходом 20% был получен пентапептид H-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH (V) и после присоединения остатка цистеина — С-концевой защищенный гексапептид Boc-Cys-(AcM)-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH (XVII) (см. схему 3, путь Б).

761



ВЭЖХ фрагментов α -г-ANP: 24—28 (а), 23—28 (б), 17—27 (в), 17—28 (г). Spherisorb ODS (4,6 $\times$ 250 мм). Градиент ацетонитрила в 0,05 М KH_2PO_4 (рН 3,0); скорость элюента 1 мл/мин. В случае пептидов (б), (в) и (г) S-ацетамидометильную защитную группу не удаляли

внутримолекулярного солеобразования в остатке аргинина; во-вторых, получаемый защищенный тетрапептид не требует добавления основания при конденсации в присутствии дифенилфосфорилазида, и, наконец, получаемый тетрапептид (III) является универсальным продуктом для синтеза как фрагмента 23—27, так и 23—28. Однако, как было отмечено выше, выход пентапептида H-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH (V) оказался крайне низким (20%), поэтому в дальнейшем синтез фрагмента 23—28 был осуществлен последовательным наращиванием пептидной цепи, исходя из *трет*-бутилового эфира тирозина или простого *трет*-бутилового эфира тирозина (см. схему 3, путь А). В обоих случаях после удаления защитных групп с удовлетворительным выходом был получен гексапептид H-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH (XVIa). Пентапептид Boc-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-OH (IV) был получен с выходом 89% из соединения (III) после удаления с него защитных групп и конденсации полученного свободного тетрапептида с Boc-Cys(Acm)-ONp.

Дальнейшая конденсация фрагмента 17—22 (Ха) с фрагментом 23—27 (IVa) или 23—28 (XVIa) проводилась согласно схеме 1. При этом выход защищенных пептидов с последовательностью 17—27 (XI) и 17—28 (XXIII) составил 75 и 86% соответственно.

Структура полученных соединений подтверждена данными ПМР-спектров и аминокислотного анализа. Индивидуальность промежуточных соединений доказана данными ТСХ (наличие только одного продукта в трех различных хроматографических системах). Фрагменты 17—27, 17—28, 23—28 и 24—28 после удаления *трет*-бутильных защит с помощью трифторуксусной кислоты по стандартной методике содержали не менее 90% основного вещества по данным ВЭЖХ (рисунок) и использовались в дальнейшем синтезе без очистки.

Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты и их производные фирм Reanal (Венгрия), Fluka (Швейцария); индивидуальность полученных соединений проверяли методом ТСХ на хроматографических пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системах растворителей: хлороформ — метанол — 32% уксусная кислота, 60 : 45 : 20 (А); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 3 : 1 : 1 (Б); *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 10,5 : 6 : 1 : 7,5 (В); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 45 : 20 : 6 : 11 (Г); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 120 : 40 : 6 : 4 (Д); хлороформ — метанол — 25% NH_4OH , 30 : 22 : 10 (Е); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 32 : 2 : 1 (Ж); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 9 : 1 : 0,5 (З), этилацетат (ИК). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидрина или хлор-бензида. Гидрирование пептидов проводили в присутствии 10% Pd/C фирмы Fluka или Merck. Катализатора брали 5—10% от веса пептида. Приведенные температуры плавления (не скорректированы) определяли на приборе Boetius (ГДР).

Удельное вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer (США). Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных в 6 н. HCl с 2% фенола при 110° С в те-

чение 24 ч, проводили на автоматическом анализаторе Labotron Liquimat (ФРГ). Цистеин не определяли.

ВЭЖХ осуществляли на приборе Altex 332 с использованием детектора Altex/Hitachi 155-40 при длине волны 220 нм. Для разделения применяли ацетонитрил (Merck Lichrosolv), воду и трифторуксусную кислоту, трижды перегнанную в стеклянной посуде, K_2HPO_4 (Sigma). Образцы для ВЭЖХ готовили следующим образом: навеску образца (2—3 мг) растворяли в 3 мл трифторуксусной кислоты и выдерживали 40 мин при 20° С. Кислоту упаривали, остаток растворяли в 1 мл воды и анализировали методом ВЭЖХ. Индивидуальность полученных соединений подтверждали спектрами ПМР, снятыми на спектрометре Bruker WH-500 (ФРГ) с рабочей частотой 500 МГц при 37° С. Химические сдвиги в спектре ПМР измерены относительно внутреннего стандарта — 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоната натрия. Отнесение сигналов сделано с помощью двойного резонанса. Образцы для спектров готовили растворением 1 мг соединения в 0,5 мл диметилсульфоксида- d_6 . Органические растворители после экстракции и промывки водой сушили безводным Na_2SO_4 . Растворы упаривали на ротарном испарителе при 40° С. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L40-100 (ЧССР).

Z-Phe-Arg-OH (I). 10,40 г (24 ммоль) *Z-Phe-ONp* растворяли в 100 мл DMF и к полученному раствору прибавляли 3,48 г (20 ммоль) аргинина. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 20° С, упаривали до небольшого объема и обрабатывали 150 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром и дважды переосаждали из этилового спирта эфиром. Получали 7,40 г (81%) соединения (I) с т. пл. 131—133° С. $[\alpha]_D^{15} = -15,2^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,77 (A); 0,65 (B); 0,63 (B).

Z-Ser(Bu^t)-Phe-Arg-OH (II). 6,20 г (13,6 ммоль) соединения (I) гидрировали в 100 мл метанола в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 40 мл DMF и к полученному раствору прибавляли 7,00 г (15,3 ммоль) *Z-Ser(Bu^t)-ONB*. Реакционную смесь перемешивали 24 ч при 20° С, упаривали до небольшого объема, остаток растворяли в этилацетате и переосаждали эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 20 мл хлороформа и делили на колонке (2,5 × 40 см) с силикагелем в системе хлороформ — метанол (8 : 2). Фракции, соответствующие главному продукту (контроль ТСХ), объединяли, упаривали и переосаждали из этилового спирта эфиром. Получали 6,77 г (83%) соединения (II) с т. пл. 107—109° С, $[\alpha]_D^{15} = -6,4^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,85 (A); 0,30 (Г); 0,68 (B).

Boc-Asn-Ser(Bu^t)-Phe-Arg-OH (III). 3,0 г (5,7 ммоль) соединения (II) гидрировали в 70 мл метанола в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 30 мл DMF и к полученному раствору добавляли 2,2 г (5,7 ммоль) *Boc-Asn-ONp*. Реакционную смесь выдерживали 15 ч при 20° С, упаривали, остаток обрабатывали эфиром, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром. После переосаждения из хлороформа эфиром получили 3,00 г (88%) соединения (III) с т. пл. 152—155° С, $[\alpha]_D^{15} = -20,5^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,81 (A); 0,46 (Г); 0,63 (B).

Boc-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-OH (IV). 1,7 г (2,5 ммоль) соединения (III) обрабатывали 1 ч 40 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь упаривали, остаток обрабатывали 120 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 80 мл воды и обрабатывали дауксом в OH⁻ форме до pH 10. Смола отфильтровывали, промывали на фильтре водой, объединенные фильтраты упаривали с изопропиловым спиртом. Остаток растворяли в 20 мл DMF, к полученному раствору добавляли 1,1 г (2,7 ммоль) *Boc-Cys(Acm)-ONp*. Через 20 ч реакционную смесь разбавляли 100 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали и дважды кристаллизовали из хлороформа. Получили 2,1 г (89%) соединения (IV) с т. пл. 153—155° С, $[\alpha]_D^{15} = -7,8^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,58 (A); 0,52 (Б); 0,57 (B). Аминокислотный состав: Asp 0,96 (1); Ser 0,92 (1); Phe 1,08 (1); Arg 1,04 (1). ПМР ($\text{DMSO}-d_6$, δ , м. д.): Acm — 8,62 (1H, NH); 4,28, 4,15 (2H, CH_2); 1,85 (3H, CH_3); Cys — 6,97 (1H, NH); 4,17 (1H, $\alpha\text{-CH}$); 2,88, 2,62 (2H, $\beta\text{-CH}_2$); Asn — 8,13 (1H, NH); 4,55 (1H, $\alpha\text{-CH}$); 2,52, 2,43 (2H, $\beta\text{-CH}_2$); 7,40, 6,93 (2H, NH_2 — амид); Ser — 7,68 (1H, NH); 4,23 (1H, $\alpha\text{-CH}$); 3,58, 3,48 (2H, $\beta\text{-CH}_2$); 5,79 (1H, OH); Phe — 8,38 (1H, NH); 4,37 (1H, $\alpha\text{-CH}$); 3,09, 2,84 (2H, $\beta\text{-CH}_2$); Arg — 7,52 (1H, NH); 3,89 (1H, $\alpha\text{-CH}$); 1,62, 1,55 (2H, $\beta\text{-CH}_2$); 1,44 (м, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$); 1,38 (3H, Boc).

H-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH (V). 0,68 г (1,0 ммоль) соединения (III) и 0,30 г (1,0 ммоль) *H-Tyr(Bu^t)-OBu^t* растворяли в 5 мл DMF, охлаждали до 0° С и прибавляли 0,27 мл (1,25 ммоль) дифенилфосфорилиазида (Fluka). Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 20° С, упаривали, остаток обрабатывали 50 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, растворяли в 10 мл метанола и осаждали 2% серной кислотой. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Полученное соединение обрабатывали 1 ч 30 мл трифторуксусной кислоты, упаривали, остаток обрабатывали 60 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, растворяли в смеси метанол — вода (1 : 1) и обрабатывали дауксом в ацетатной форме. Смола отфильтровывали, промывали на фильтре метанолом, объединенные фильтраты упаривали, остаток растворяли в 15 мл метанола и подвергали очистке с помощью хроматографии на колонке Lobar size B, Lichгорер RP-8 (40—63 мкм, Merck) с использованием градиента от воды к метанолу (оба растворителя содержали 0,1% CF_3COOH). Фракции, соответствующие главному пику, объединяли, упаривали и переосаждали из метанола эфиром. Получено 0,25 г (20%)

соединения (V) в виде аморфного порошка, гомогенного по ВЭЖХ (см. рис. 1а). R_f 0,30 (B); 0,22 (A).

Z-Ser(Bu⁴)-Gly-OH (VI). 0,75 г (10 ммоль) глицина растворяли в 10 мл 1 н. NaOH и к полученному раствору прибавляли раствор 4,72 г (10 ммоль) *Z-Ser(Bu⁴)-ONB* в 60 мл DMF. Через 15 ч реакционную смесь упаривали, остаток разбавляли 100 мл 2% серной кислоты, трижды экстрагировали эфиром, органический слой промывали водой до нейтральной реакции, сушили, упаривали. После кристаллизации из эфира получили 3,00 г (85%) соединения (VI) с т. пл. 80—84° С, $[\alpha]_D^{15}$ —13,1° (с 1, DMF). R_f 0,47 (D); 0,68 (З); 0,87 (B).

Z-Gln-Ser(Bu⁴)-Gly-OH (VII). 2,8 г (8 ммоль) соединения (VI) гидрировали в 45 мл метанола в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, промывали метанолом, к фильтрату добавляли 4 мл (8 ммоль) 40% раствора триптона В (Fluka) в метаноле и упаривали досуха. Остаток растворяли в 50 мл DMF, к полученному раствору добавляли 3,2 г (8 ммоль) *Z-Gln-ONP*. Через 15 ч реакционную смесь упаривали до небольшого объема, остаток разбавляли 100 мл воды, трижды экстрагировали эфиром, водный слой подкисляли 2% серной кислотой до pH 2 и экстрагировали 90 мл *n*-бутанола. Органический слой промывали водой, упаривали, переохлаждали из метанола эфиром. Получили 3,4 г (88%) соединения (VII) с т. пл. 165—170° С, $[\alpha]_D^{15}$ +12,8 (с 1, DMF). R_f 0,75 (A); 0,67 (B); 0,65 (B).

Boc-Ala-Gln-Ser(Bu⁴)-Gly-OH (VIII). Тетрапептид (VIII) получали аналогично соединению (VII) из 4,2 г (8,7 ммоль) соединения (VII), 4,35 мл триптона В в метаноле и 2,5 г (8,7 ммоль) *Boc-Ala-ONSu*. Выход 2,92 г (65%), т. пл. 190—192° С, $[\alpha]_D^{20}$ +10,6° (с 1, DMF). R_f 0,61 (A); 0,64 (B); 0,68 (B). ПМР (DMSO-*d*₆, δ, м.д.): Ala —6,96 (1H, NH); 3,97 (1H, α-CH); 1,17 (3H, β-CH₃); Gln —7,89 (1H, NH); 4,29 (1H, α-CH); 1,72, 1,87 (2H, β-CH₂); 2,09 (2H, γ-CH₂); 6,70, 7,22 (2H, NH₂-амид); Ser —7,82 (1H, NH); 4,35 (1H, α-CH); 3,46 (2H, β-CH₂); Gly —8,10 (1H, NH); 3,76 (2H, α-CH₂); 1,37 (3H, Boc); 1,10 (3H, Bu⁴).

Boc-Leu-Gly-OBzl (IX). 2,13 г (5,43 ммоль) *Boc-Leu-ONB* растворяли в 30 мл DMF. К полученному раствору прибавляли раствор 1,83 г (5,43 ммоль) тозилата бензилового эфира глицина и 0,75 мл (5,43 ммоль) триэтиламина в 20 мл DMF. Через 12 ч реакционную смесь упаривали, остаток разбавляли 60 мл 2% серной кислоты, экстрагировали этилацетатом, органический слой промывали водой до нейтральной реакции, сушили, упаривали и сушили в вакуум-экскаторе. Получено 2,01 г (96%) соединения (IX) в виде масла. R_f 0,76 (Ж); 0,91 (Г); 0,94 (A).

Boc-Ala-Gln-Ser(Bu⁴)-Gly-Leu-Gly-OBzl (X). 3,2 г (8,4 ммоль) соединения (IX) обрабатывали 1 ч 100 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в небольшом количестве эфира и осаждали гексаном. Выпавшее масло отделяли декантацией, растворяли в 100 мл смеси изопропиловый спирт — вода (1 : 1) и обрабатывали дауэксом в OH⁻-форме при охлаждении до —40° С. Смола отфильтровывали, промывали смесью изопропилового спирта с водой (1 : 1), объединенные фильтраты упаривали досуха, затем дважды упаривали с изопропиловым спиртом, остаток сушили в вакуум-экскаторе над NaOH, растворяли в 50 мл DMF. К полученному раствору добавляли 2,9 г (6,4 ммоль) соединения (VIII), полученный раствор охлаждали до —10° С и добавляли 6,4 г (8,4 ммоль) «комплекса F». Реакционную смесь выдерживали 1 ч при 4° С и 5 ч при комнатной температуре. Выпавший гель растворяли при нагревании, N,N'-дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали до половины объема и осаждали этилацетатом. Выпавший осадок отфильтровывали, сушили. После кристаллизации из этанола получено 3,3 г (75%) соединения (X) с т. пл. 224—226° С, $[\alpha]_D^{15}$ +74° (с 1, DMF). R_f 0,73 (A); 0,88 (B); 0,91 (B). ПМР (DMSO-*d*₆, δ, м.д.): 1,37 (3H, Boc); 1,08 (3H, Bu⁴); Ala —6,96 (1H, NH); 3,97 (1H, α-CH); 1,17 (3H, β-CH₃); Gln —7,89 (1H, NH); 4,29 (1H, α-CH); 1,88, 1,73 (2H, β-CH₂); 2,09 (м, 2H, γ-CH₂); 7,19, 6,73 (2H, NH₂-амид); Ser —7,86 (1H, NH); 4,31 (1H, α-CH); 3,46 (м, 2H, β-CH₂); Gly —8,04 (1H, NH); 3,75 (м, 2H, CH₂); Leu —7,94 (1H, NH); 4,34 (1H, α-CH); 1,45 (2H, β-CH₂); 1,59 (1H, γ-CH); 0,81 (3H, δ-CH₃); 0,85 (3H, δ-CH₃); 5,11 (2H, CH₂-Ph). Аминокислотный состав: Ser 0,85 (1); Glu 1,03 (1); Gly 2,12 (2); Ala 0,96 (1); Leu 1,06 (1).

Boc-Ala-Gln-Ser(Bu⁴)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-OH (XI). а) 0,58 г (0,75 ммоль) соединения (X) гидрировали в 20 мл DMF в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, промывали на фильтре DMF, упаривали до объема 10 мл, добавляли 0,18 г (0,98 ммоль) HONB и при перемешивании добавляли 0,18 г (0,84 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при —10° С, 2 ч при 4° С, далее 10 ч при 20° С. Выпавшую N, N'-дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали до небольшого объема, остаток обрабатывали 40 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакуум-экскаторе. Получали 0,58 г (90%) *Boc-Ala-Gln-Ser(Bu⁴)-Gly-Leu-Gly-ONB (Xa)*. 0,34 г полученного соединения растворяли в 5 мл DMF.

б) 0,45 г (0,5 ммоль) соединения (IV) обрабатывали 1 ч 25 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь упаривали, к остатку добавляли эфир, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 30 мл воды и обрабатывали дауэксом в OH⁻-форме до pH 10. Смола отфильтровывали, промывали на фильтре водой, объединенные фильтраты упаривали с изопропиловым спиртом досуха, остаток растирали с эфиром, фильтровали, сушили. Растворяли в 5 мл DMF и при перемешивании добавляли к раствору, полученному по пункту «а». Реакционную смесь перемешивали 15 ч при 20° С и осаждали этилацетатом. После повторного пере-

осаждения из DMF этилацетатом получили 0,54 г (75%) соединения (XI) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D^{20} +13,5^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,67 (А); 0,47 (Б); 0,20 (Г). Аминокислотный состав: Asp 1,16 (1); Ser 1,86 (2); Glu 1,09 (1); Gly 2,04 (2); Ala 1,00 (1); Leu 1,08 (1); Phe 1,17 (1); Arg 0,99 (1).

Z-Arg(NO₂)-Tyr(Bu^t)-OH (XII). 1,3 г (5,5 ммоль) *N*-Tyr(Bu^t)-OH растворяли в 2,75 мл 40% тритона В в метаноле, полученный раствор упаривали, к остатку добавляли 30 мл DMF и 3,0 г (5,5 ммоль) *Z*-Arg(NO₂)-OPfp. Реакционную смесь выдерживали 8 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в 120 мл этилацетата, дважды промывали 2% серной кислотой, водой, сушили, упаривали. После кристаллизации из эфира получили 2,0 г (63%) соединения (XII) с т. пл. 123—125° С, $[\alpha]_D^{20} -4,3^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,24 (Б); 0,81 (Б); 0,76 (Б).

Z-Phe-Arg-Tyr(Bu^t)-OH (XIII). 2,5 г (4,32 ммоль) соединения (XII) гидрировали в 50 мл ледяной уксусной кислоты. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток обрабатывали 150 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе над NaOH, растворяли в 30 мл DMF и к полученному раствору добавляли 2,1 г (5 ммоль) *Z*-Phe-ONp. Реакционную смесь выдерживали 10 ч при 20° С, упаривали, остаток обрабатывали 120 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили. После кристаллизации из этанола получили 2,0 г (67%) соединения (XIII) с т.пл. 152—155° С, $[\alpha]_D^{20} -8,6^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,84 (А); 0,47 (Б); 0,67 (Б).

Z-Ser(Bu^t)-Phe-Arg-Tyr(Bu^t)-OH (XIV). 1,96 г (2,9 ммоль) соединения (XIII) гидрировали в 50 мл метанола, катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 20 мл DMF, к полученному раствору добавляли 1,50 г (3,2 ммоль) *Z*-Ser(Bu^t)-ONp. Реакционную смесь выдерживали 10 ч при 20° С, упаривали. Остаток растворяли в 100 мл этилацетата, трижды промывали водой и упаривали. Остаток кристаллизовали из эфира. Получили 1,40 г (59%) соединения (XIV) с т.пл. 146—148° С, $[\alpha]_D^{20} -5,6^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,82 (А); 0,49 (Б); 0,70 (Б).

Z-Asn-Ser(Bu^t)-Phe-Arg-Tyr(Bu^t)-OH (XV). Пентапептид (XV) получали по методике, аналогичной для (XIV), из 1,4 г (1,7 ммоль) соединения (XIV) и 0,8 г (1,9 ммоль) *Z*-Asn-ONp. После кристаллизации из хлороформа получено 1,5 г (93%) соединения (XV) с т.пл. 171—173° С, $[\alpha]_D^{20} -12,6^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,71 (А); 0,39 (Б); 0,69 (Б).

Boc-Cys(Acm)-Asn-Ser(Bu^t)-Phe-Arg-Tyr(Bu^t)-OH (XVI). Гексапептид (XVI) получали по методике, аналогичной для соединения (XIV), из 1,46 г (1,56 ммоль) соединения (XV) и 0,67 г (1,62 ммоль) *Boc*-Cys(Acm)-ONp. Получили 1,29 г (75%) соединения (XVI) с т.пл. 198—200° С, $[\alpha]_D^{20} -19,6^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,76 (А); 0,37 (Б); 0,66 (Б). Аминокислотный состав: Asp 1,00 (1); Ser 0,79 (1); Tyr 1,00 (1); Phe 1,01 (1); Arg 0,99 (1). ПМР (DMSO-*d*₆, δ, м.д.): Cys —6,57 (1H, NH); 4,17 (1H, α-CH); 2,88, 2,62 (2H, β-CH₂); Asn —8,14 (1H, NH); 4,57 (1H, α-CH); 2,54, 2,42 (2H, β-CH₂); 7,46, 6,98 (2H, NH₂-амид); Ser —7,84 (1H, NH); 4,18 (1H, α-CH); 3,54 (2H, β-CH₂); Phe —7,93 (1H, NH); 4,51 (1H, α-CH); 3,00, 2,83 (2H, β-CH₂); 7,17 (5H, ароматич.); Arg —7,81 (1H, NH); 4,28 (1H, α-CH); 1,76, 1,70 (2H, β-CH₂); 1,49, 1,35 (2H, γ-CH₂); 3,06, 2,98 (2H, δ-CH₂); Tyr —7,81 (1H, NH); 4,124 (1H, α-CH); 3,07, 2,73 (2H, β-CH₂); 7,09, 6,78 (4H, ароматич.); Acm —8,55 (1H, NH); 4,28 (2H, CN₂); 1,84 (3H, CH₃); 1,04, 1,23 (2с, 18H, Bu^t); 1,38 (9H, Boc).

Boc-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH (XVII). 0,40 г (0,42 ммоль) соединения (V) растворяли в 5 мл DMF и добавляли 0,17 г (0,40 ммоль) *Boc*-Cys(Acm)-ONp. Через 3 ч реакционную смесь упаривали, оставшееся масло пересаждали из изопропилового спирта эфиром. Получено 0,2 г (56%) соединения (XVII) в виде аморфного порошка. R_f 0,56 (А); 0,32 (Б); 0,60 (Г).

Z-Arg(NO₂)-Tyr(Bu^t)-OBu^t (XVIII). а) 1,96 г (6 ммоль) HCl·*N*-Tyr(Bu^t)-OBu^t растворяли в 30 мл DMF. К полученному раствору добавляли 0,83 мл (6 ммоль) триэтиламина. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали DMF и объединенные фильтраты упаривали. Остаток растворяли в 30 мл DMF.

б) 1,76 г (5 ммоль) *Z*-Arg(NO₂)-OH растворяли в 25 мл DMF, добавляли 0,56 мл (5 ммоль) *N*-метилморфолина, охлаждали до —20° С и прибавляли 0,65 мл (5 ммоль) изобутилхлорформата. Через 3 мин к реакционной смеси прибавляли охлажденный до —20° С раствор, полученный по способу «а». Через 2 ч реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, последовательно промывали 2% серной кислотой, водой, 5% раствором NaHCO₃, водой, сушили, упаривали. После кристаллизации из спирта получено 2,17 г (70%) соединения (XVIII) с т.пл. 167—168° С, $[\alpha]_D^{20} -0,6^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,46 (З); 0,74 (Г); 0,50 (Н).

Z-Phe-Arg-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HBr (XIX). 1,76 г (2,8 ммоль) соединения (XVIII) гидрировали в 50 мл ледяной уксусной кислоты в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 15 мл DMF и добавляли 0,45 г (2,8 ммоль) бромгидрата пиридина и 1,18 г (2,8 ммоль) *Z*-Phe-ONp. Реакционную смесь выдерживали 15 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в 70 мл *n*-бутанола и промывали водой. Органический слой упаривали, остаток пересаждали из изопропилового спирта эфиром. Получено 1,52 г (67%) соединения (XIX), т.пл. 98—99° С, $[\alpha]_D^{20} -9,7^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,76 (Б); 0,71 (Г); 0,83 (А).

Z-Ser(Bu^t)-Phe-Arg-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HBr (XX). 1,47 г (1,8 ммоль) соединения (XIX) гидрировали в 40 мл метанола в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 20 мл DMF и добавляли 0,83 г (1,8 ммоль)

Z-Ser(Bu^t)-ONB. Через 2 ч реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 50 мл *n*-бутанола и промывали водой. Органический слой упаривали, остаток пересаждали из изопропилового спирта эфиром. Получено 1,46 г (83%) соединения (XX). с т. пл. 97—98° С, $[\alpha]_D^{20} = -10,5^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,78 (Б); 0,86 (А); 0,71 (Г).

Z-Asn-Ser(Bu^t)-Phe-Arg-Tyr(Bu^t)-OBu^t-HBr (XXI). 1,40 г (1,27 ммоль) соединения (XX) гидрировали в 50 мл метанола в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 20 мл DMF, к полученному раствору прибавляли 0,57 г (1,5 ммоль) Z-Asn-ONp. Через 4 ч реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 60 мл *n*-бутанола и промывали водой. Бутанол упаривали, остаток пересаждали из изопропилового спирта гексаном. Получено 1,28 г (82%) соединения (XXI) с т. пл. 143—144° С, $[\alpha]_D^{20} = -21,7^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,68 (Б); 0,80 (А); 0,62 (Г).

Boc-Cys(Acm)-Asn-Ser(Bu^t)-Phe-Arg-Tyr(Bu^t)-OBu^t-HBr (XXII). 1,25 г (1,17 ммоль) соединения (XXI) гидрировали в 40 мл метанола в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 15 мл DMF, к полученному раствору добавляли 0,48 г (1,17 ммоль) Boc-Cys(Acm)-ONp. Через 4 ч реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 60 мл *n*-бутанола, промывали водой. Бутанол упаривали, остаток пересаждали из изопропилового спирта гексаном. Получено 1,25 г (92%) соединения (XXII) с т. пл. 129—131° С, $[\alpha]_D^{20} = -37,2^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,71 (А); 0,56 (Б); 0,75 (Г). ПМР (DMSO-*d*₆, δ , м. д.): Cys — 6,97 (1H, NH); 4,19 (1H, α -CH); 2,85, 2,63 (2H, β -CH₂); Asn — 8,05 (1H, NH); 4,59 (1H, α -CH); 2,56, 2,45 (2H, β -CH₂); 7,48, 7,01 (2H, NH₂-амид); Ser — 7,87 (1H, NH); 4,18 (1H, α -CH); 3,39, 3,34 (2H, β -CH₂); Phe — 7,92 (1H, NH); 4,52 (1H, α -CH); 3,00, 2,86 (2H, β -CH₂); 7,20 (3H, ароматич.); Arg — 7,98 (1H, NH); 4,34 (1H, α -CH); 1,70, 1,49 (2H, β -CH₂); 7,52 (1H, NH-гуанид.); Tyr — 8,19 (1H, NH); 4,32 (1H, α -CH); 2,90 (2H, β -CH₂); 6,87, 7,13 (4H, ароматич.); Acm — 8,51 (1H, NH); 4,29, 4,14 (2H, CH₂); 1,84 (3H, CH₃); 1,04, 1,26, 1,24 (27H, Bu^t); 1,38 (9H, Boc).

Boc-Ala-Gln-Ser(Bu^t)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH (XXIII). Дodeкапептид (XIII) получали по методике, аналогичной для соединения (XI).

а) 0,25 г (0,23 ммоль) соединения (XVI) обрабатывали 1 ч 25 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь упаривали, к остатку добавляли эфир, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 30 мл воды и обрабатывали дауэком в ацетатной форме. Смола отфильтровывали, промывали на фильтре водой, объединенные фильтраты упаривали с изопропиловым спиртом досуха, остаток растирали эфиром, фильтровали, сушили. Полученный гексапептид H-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH (XVIa) растворяли в 5 мл DMF.

б) 0,2 г (0,23 ммоль) Boc-Ala-Gln-Ser(Bu^t)-Gly-Leu-Gly-ONB (Xa) растворяли в 5 мл DMF и прибавляли к раствору, полученному по способу «а». Выход соединения (XXIII) 0,31 г (86%) в виде аморфного порошка, $[\alpha]_D^{20} = -2,0^\circ$ (с 1, DMF). R_f 0,58 (А); 0,33 (Б); 0,57 (В). Аминокислотный состав: Asp 0,92 (1); Ser 1,74 (2); Glu 1,09 (1); Gly 2,00 (2); Ala 1,07 (1); Leu 1,05 (1); Tyr 0,89 (1); Phe 0,97 (1); Arg 0,91 (1).

ЛИТЕРАТУРА

1. deBold A. J., Bornestein H. B., Veress A. T., Sonnenberg H. // Life Sci. 1981. V. 28. № 1. P. 89—94.
2. Needleman P., Adams S. P., Cole B. R., Currie M. G., Geller D. M., Michener M. L., Saper C. B., Schwartz D., Standaert D. G. // Hypertension. 1985. V. 7. № 4. P. 469—482.
3. Geller D. M., Currie M. G., Wakitani B. R., Cole B. R., Adams S. R., Fok K. F., Siegel S. R., Needleman P. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 120. № 2. P. 333—338.
4. Pegram B. L., Trippodo N. C., Natsume T., Kardon M. B., Frohlich E. D., Cole F. E. // Fed. Proc. 1986. V. 45. № 9. P. 2382—2386.
5. Zisfein J. B., Matsueda G. R., Fallon J. T. // J. Mol. Cell Cardiol. 1986. V. 18. № 9. P. 917—929.
6. Sugiyama M., Fukumi H., Grammer R. T., Misono K. S., Yabe Y., Morisawa Y. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 123. № 1. P. 338—344.
7. Ballermann B. J., Brenner B. M. // J. Clin. Invest. 1985. V. 76. № 6. P. 2041—2048.
8. Balasubramanian T. M., Needleman P., Currie M. G., Geller D. M., Cole B. R., Marshall G. R. // Proc. 18th European Peptide Symposium. Stockholm, Sweden, 1984. P. 509—512.
9. Wade J. D., Fitzgerald S. P., McDonald M. R., McDougall J. G., Tregear G. W. // Biopolymers. 1986. V. 25. № 1. P. S21—S37.
10. Nutt R. F., Brady S. F., Lyle T. A., Paleveda T. M., Ciccarone W. J., Blaine E. H., Bennett C. D. // Proc. 18th European Peptide Symposium, Stockholm, Sweden, 1984. P. 513—516.
11. Thibault G., Garcia R., Cantin M., Seldah N., Lazure C., Chretien M. Евр. пат. 1985, № 0140731.
12. Johansen N. L., Faarup P. // Proc. 19th European Peptide Symposium, Porto Carras, 1986, B.—N. Y., 1987. P. 210—214.

Поступила в редакцию
20.X.1987

ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDES. I. SYNTHESIS
OF C-TERMINAL FRAGMENTS

OVCHINNIKOV M. V., BESPALOVA Z. D., MOLOKOEDOV A. S.,
REVENKO I. V., SEPETOV N. F., ISAKOVA O. L.,
TITOV M. I.

*All-Union Cardiology Research Centre,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

C-terminal fragments of atrial natriuretic peptides have been synthesized by classical methods of peptide chemistry in solution and characterized by various physico-chemical methods. The choice of the scheme and methods of synthesis is discussed.