



УДК 577.175.85'17

## АТРИАЛЬНЫЕ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ III\*. СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ $\alpha$ -r-ANP, AP II, AP III, И des-Ser<sup>5</sup>,Ser<sup>6</sup>-AP II

*Овчинников М. В., Беспалова Ж. Д., Молокозедов А. С.,  
Титов М. И., Ревенко И. В., Виноградов В. А.,  
Горобов Н. В., Жуковский С. В.*

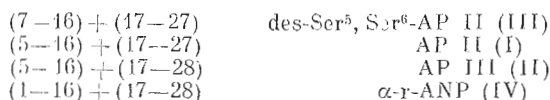
*Всесоюзный кардиологический научный центр  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Исходя из ранее синтезированных фрагментов атриальных натрийуретических пептидов с помощью «комплекса F» получены  $\alpha$ -r-ANP, AP II, AP III и des-Ser<sup>5</sup>,Ser<sup>6</sup>-AP II. Удаление S-ацетамидометильной защиты с остатков цистеина проводили с одновременной циклизацией. Проведена оценка биологической активности атриальных натрийуретических пептидов.

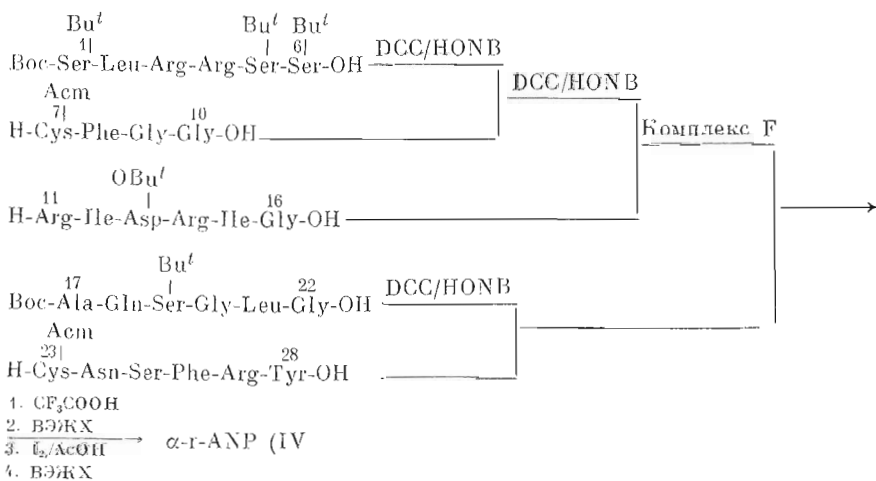
В предыдущих сообщениях [1, 2] нами был описан синтез N- и C-концевых фрагментов атриальных натрийуретических пептидов, а именно  $\alpha$ -r-ANP, AP II, AP III и des-Ser<sup>5</sup>,Ser<sup>6</sup>-AP II.

Настоящая работа посвящена синтезу этих соединений и сравнительному изучению их биологической активности.

Все ANP были синтезированы нами конденсацией двух больших фрагментов:



Общая схема синтеза всех ANP может быть представлена следующим образом (на примере  $\alpha$ -r-ANP, см. схему):



\* Сообщение II см. [1]. Условные сокращения: ANP — атриальные натрийуретические пептиды;  $\alpha$ -r-ANP — атриальный натрийуретический пептид крысы; AP II —  $\alpha$ -r-ANP-(5-27)-пептид; AP III —  $\alpha$ -r-ANP-(5-28)-пептид; DMF — N,N-диметилформамид; AcM — ацетамидометил; HONB — N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбонимид; DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид; «комплекс F» — кристаллический аддукт 1 моль DCC и 3 моль пентафторфенола.

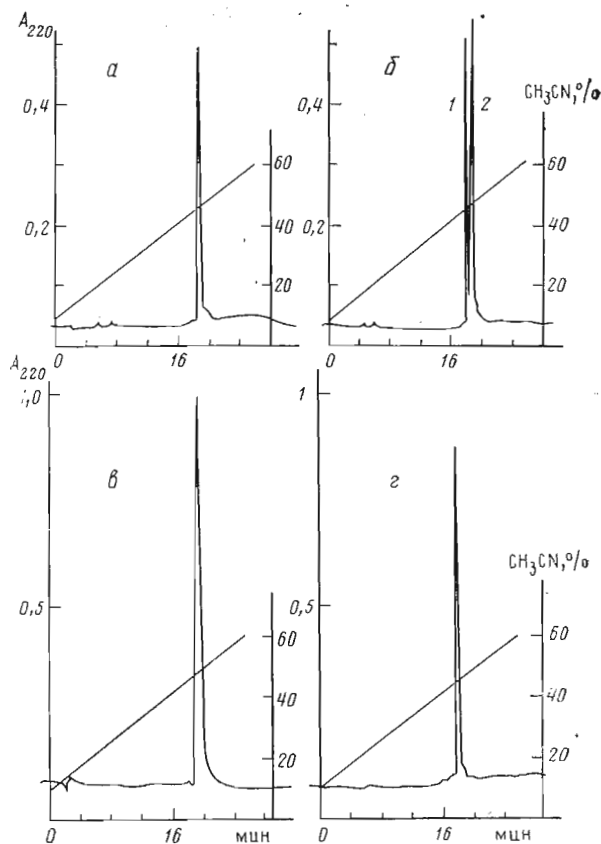


Рис. 1. ВЭЖХ на колонке Spherisorb ODS (4,6×250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (10 → 60% за 25 мин) в 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 3) AP III (а), AP III до (1) и после (2) циклизации (б),  $\alpha$ -г-ANP (в), AP II (г). Скорость элюции 1 мл/мин

Последнюю конденсацию двух больших фрагментов для синтеза всех ANP проводили с помощью «комплекса Г». Например, в случае  $\alpha$ -г-ANP была осуществлена конденсация фрагментов 1—16 и 17—28. При этом предварительно активировали N-концевой фрагмент. Следует отметить, что активирование фрагмента 1—16 вызывало некоторые затруднения. Во-первых, защищенный гексадекапептид плохо растворялся в DMF, а во-вторых, даже в течение продолжительного времени не наблюдалось образования активированного производного (по данным ТСХ). Эти осложнения характерны для всех N-концевых фрагментов ANP. Мы предположили, что образованию активированного эфира препятствует ионизация карбоксильной группы фрагмента за счет образования ею внутренней соли с одним из остатков аргинина. Проблему удалось решить прибавлением к реакционной смеси бромгидрата пиридина в количестве, эквивалентном числу остатков аргинина в активируемом фрагменте. При этом разрушается внутренняя соль и, кроме того, резко возрастает растворимость активируемого соединения, в результате чего быстро и количественно образуется пентафторфениловый эфир N-концевого фрагмента. К полученному таким образом соединению прибавляли C-концевой фрагмент. Образовавшийся защищенный пептид обрабатывали трифторуксусной кислотой, после чего проводили очистку с помощью ВЭЖХ (см. рис. 1). Удаление S-ацетамидометильных групп с одновременной циклизацией проводили иодом в водном метаноле [3] или в водной уксусной кислоте [4]. Лучшие результаты были получены при использовании 80% водной уксусной кислоты. При этом быстрая и однозначная циклизация (с выходом ~97%) проходила при достаточной высокой концентрации пептида (100 мг пептида в 70 мл раствора). После очистки методом ВЭЖХ все ANP были получены с выходом ~20%, считая на исходный N-концевой фрагмент.

**Данные аминокислотного анализа полученных атриальных  
натрийуретических пептидов \***

Соедине- ние	Ala	Arg	Leu	Ile	Asp
I	1,14(1)	2,97(3)	0,91(1)	1,85(2)	2,00(2)
II	1,09(1)	3,02(3)	0,95(1)	1,91(2)	2,07(2)
III	1,18(1)	3,11(3)	0,98(1)	1,88(2)	1,91(2)
IV	1,03(1)	4,32(5)	1,99(2)	1,76(2)	1,97(2)

Соедине- ние	Ser	Tyr	Phe	Gly	Glu
I	3,20(4)	—	1,95(2)	4,67(5)	1,22(1)
II	3,23(4)	0,78(1)	1,96(2)	5,30(5)	1,07(1)
III	1,86(2)	—	2,04(2)	5,30(5)	1,04(1)
IV	4,27(5)	0,83(1)	1,92(2)	5,00(5)	1,08(1)

\* Цистеин не определялся.

Следует отметить, что нам удалось найти условия разделения циклических и линейных пептидов (см. рис. 1 б), что позволило контролировать протекание процесса циклизации. Это оказалось особенно важным в случае ANP, содержащих С-концевой остаток тирозина. Так, увеличение времени обработки подом растворов производных AP III и  $\alpha$ -r-ANP приводило к модификации тирозинового остатка (по данным ПМР).

Все синтезированные нами ANP имеют корректный аминокислотный состав (см. таблицу), индивидуальны по данным ТСХ и ВЭЖХ.

Биологическую активность ANP оценивали в опытах *in vivo* и *in vitro* (см. «Экспериментальную часть»).

ANP вызывали снижение артериального давления, значительное увеличение экскреции Na; диурез и экскреция K<sup>+</sup> увеличивались незначительно (см. рис. 2). Экскреция Na<sup>+</sup> увеличивалась в первые 10 мин после введения пептида, возвращаясь к исходному уровню в последующих пробах мочи.

Сравнительная натрийуретическая и гипотензивная активность исследованных ANP представлена на рис. 3.  $\alpha$ -r-ANP обладал наибольшей активностью; укорочение пептидов с N- и С-конца приводило к снижению биологической активности. Полученные данные *in vivo* позволяют представить следующий ряд сравнительной биологической активности:  $\alpha$ -r-ANP > AP III > AP II des-Ser<sup>5</sup>, Ser<sup>6</sup>-AP II.

ANP вызывали зависимое от концентрации расслабление изолированных колец аорты крысы, тонизированных простагландином F<sub>2 $\alpha$</sub> . В первой серии опытов AP II и AP III существенно не различались по активности (IC<sub>50</sub> = 18,8 ± 5,3 и 33,6 ± 10,9 нМ соответственно), но значительно превосходили des-Ser<sup>5</sup>, Ser<sup>6</sup>-AP II (IC<sub>50</sub> = 243,3 ± 65,4; отличие от AP II и AP III достоверно при *p* < 0,05). Во второй серии экспериментов было показано, что AP II и  $\alpha$ -r-ANP обладали одинаковой сосудорасширяющей активностью. Полученные данные свидетельствуют о том, что  $\alpha$ -r-ANP, AP II, AP III в использованной модели обладают сильным и приблизительно равным сосудорасширяющим действием, в то время как удаление двух остатков серина с N-конца приводит к существенному уменьшению этого вида активности.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о важной роли как N, так и С-концевой части пептида в реализации разных видов биологической активности и дают основание для поиска новых аналогов с определенным спектром фармакологического действия.

Работы, посвященные изучению сравнительной активности ANP, довольно противоречивы. Так, ряд исследований дает сходные результаты [5—7]. В то же время в некоторых работах показано, что  $\alpha$ -r-ANP,

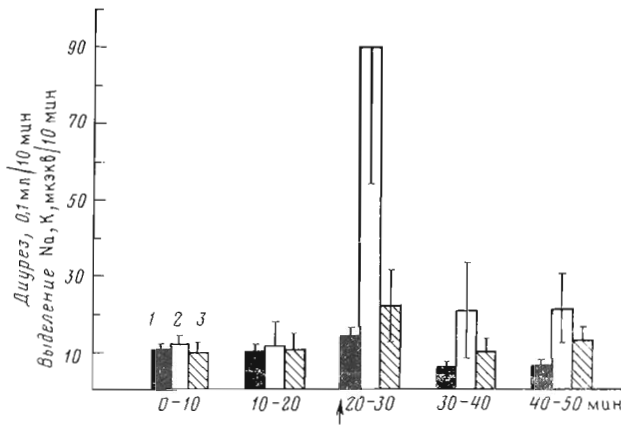


Рис. 2. Влияние АР II в дозе 8 мкг/кг на диурез (1), экскрецию натрия (2) и калия (3). Данные представлены в виде столбиков, отражающих средние величины с доверительным интервалом при  $p < 0,05$  ( $p$  — величина вероятности). Стрелкой указан момент введения АР II

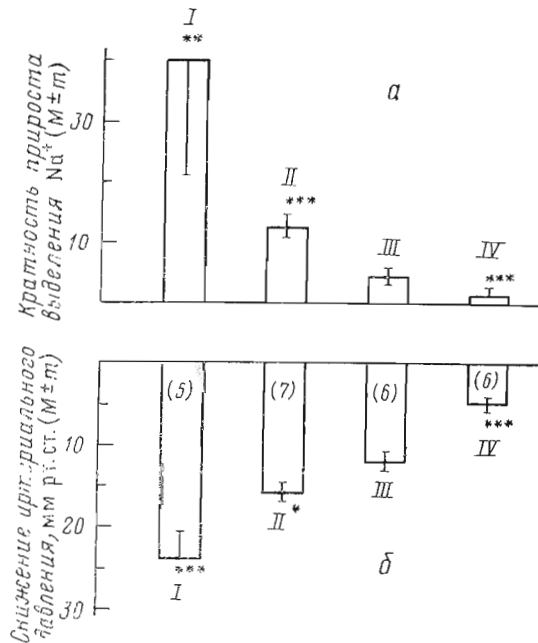


Рис. 3. Сравнительная натрийуретическая (а) и гипертензивная (б) активность  $\alpha$ -г-ANP (I в дозе 4 мкг/кг), АР III (II, 4 мкг/кг), АР II (4 мкг/кг), des-Ser<sup>5</sup>, Ser<sup>6</sup>-АР II (IV, 8 мкг/кг). Достоверность различий с эффектом АР II ( $p$ ) составляла  $< 0,1$  (\*),  $< 0,05$  (\*\*),  $0,01$  (\*\*\*)). На рис. б в скобках указано число опытов.  $M$  — средняя арифметическая величина,  $m$  — средняя ошибка

АР III, АР II и АР I (des-Phe<sup>26</sup>, Arg<sup>27</sup>-АР II) весьма сходны по сосудорасширяющей, гипотензивной и натрийуретической активности [8, 9]. Эти различия могут быть связаны с разным числом наблюдений и различиями в экспериментальных моделях. Перспективность использования ANP в качестве лекарственных средств для лечения артериальной гипертензии, сердечно-сосудистой и почечной недостаточности делает целесообразным, на наш взгляд, дальнейший поиск аналогов ANP, обладающих высокой биологической активностью и устойчивостью к ферментативной деградации.

## Экспериментальная часть

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 — пиридин — вода, 10,5 : 6 : 1 : 7,5 (Б). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью хлор-бензидина. Аминокислотный анализ пептидов, гидролизованных в 6 н. HCl с 2% фенола при 110° С в течение 24 ч, проводили на автоматическом анализаторе Labotron Liquimat (ФРГ). Результаты аминокислотного анализа приведены в таблице. ВЭЖХ проводили на приборе Altex 332 с использованием детектора Altex/Hitachi 155-40 при длине волны 220 нм. Для разделения применяли ацетонитрил фирмы Merck (Lichrosolv), воду и трифторуксусную кислоту, трижды перегнанные в стекле.  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  (Sigma).

*H-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-OH* (AP II) (I). а) 0,27 г (0,18 ммоль) Boc-Ala-Cln-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-OH [2] обрабатывали 1 ч 20 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь упаривали, оставшееся масло обрабатывали эфиром, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 20 мл воды и обрабатывали дауэксом-1 в OH<sup>-</sup>-форме. Смола отфильтровывали, промывали на фильтре водой, объединенные фильтраты упаривали досуха, остаток растирали с эфиром, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

б) 0,25 г (0,16 ммоль) Boc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Arg-Ile-Gly-OH [1] суспендировали в 3 мл DMF, добавляли 0,051 г (0,32 ммоль) бромгидрата пиридина, полученный раствор охлаждали до 0° С и при перемешивании добавляли 0,24 г (0,32 ммоль) «комплекса F». Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С, 6 ч при 20° С. Выпавшую N, N'-дициклогексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали до небольшого объема и обрабатывали 40 мл смеси этилацетат — эфир, 1 : 1. Выпавший осадок отфильтровывали, многократно промывали на фильтре эфиром, сушили и растворяли в 3 мл DMF. К полученному раствору прибавляли продукт, полученный согласно «а».

Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 20° С, добавляли 50 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Полученный продукт обрабатывали 20 мл трифторуксусной кислоты 1 ч, к реакционной смеси добавляли 70 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 20 мл воды и подвергали очистке методом ВЭЖХ на колонке (1,6 × 25 см) Silasorb C-18 (5 мкм. Chemarol, ЧССР). Для разделения использовали градиент от воды к метанолу (оба растворителя содержали 0,02 моль ацетата триэтиламина, рН 4). Время элюции 50 мин. Скорость элюции 10 мл/мин. После обессоливания на той же колонке в градиенте от 0,1% водной трифторуксусной кислоты до метанола и лиофилизации получали 0,15 г линейного продукта. Полученный лиофилизат растворяли в 20 мл 50% уксусной кислоты, к полученному раствору добавляли 70 мл раствора вода в уксусной кислоте (концентрация 2,25 мг в 1 мл). Полиоту образования дисульфидной связи контролировали методом ВЭЖХ (см. рис. 1б); как правило, реакция заканчивается через 2 ч. Для удаления избытка вода к реакционной смеси добавляли 1,8 г цинковой пыли и через 2 мин отфильтровывали, осадок промывали на фильтре водой, объединенные фильтраты упаривали до объема 30 мл и подвергали очистке методом ВЭЖХ на той же колонке. Для разделения использовали градиент от воды к метанолу (оба растворителя содержали 0,1% трифторуксусной кислоты). Время элюции 30 мин. Фракции, соответствующие главному пика, объединяли, упаривали, остаток растворяли в 30 мл воды и лиофилизали. Получено 0,10 г (20%) соединения (I). R<sub>f</sub> 0,22 (А); 0,28 (Б). Аминокислотный состав см. в табл. 1  $[\alpha]_D^{20} -44,7^\circ$  (с 1; 10% AcOH).

AP III (II). Соединение (II) получали по методике, аналогичной для получения соединения (I). Из 0,31 г (0,2 ммоль) Boc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Arg-Ile-Gly-OH [1] и 0,37 г (0,22 ммоль) Boc-Ala-Gln-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Gly-Leu-Gly-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH [2] получали 0,13 г (26%) соединения (II). R<sub>f</sub> 0,24 (А); 0,31 (Б).  $[\alpha]_D^{20} -38,8^\circ$  (с 0,53; 10% AcOH).

*des-Ser*<sup>5</sup>, *Ser*<sup>6</sup>-AP II (III). Соединение (III) получали по методике, аналогичной для получения соединения (I), из 0,73 г (0,6 ммоль) Boc-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Arg-Ile-Gly-OH [1] и 1,05 г (0,7 ммоль) Boc-Ala-Gln-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-OH [2]. Получено 0,31 г (23%) соединения (III). R<sub>f</sub> 0,29 (А); 0,23 (Б).  $[\alpha]_D^{20} -38,6^\circ$  (с 1; 10% AcOH).

*α-r-ANP* (IV). Соединение (IV) получено по методике, аналогичной для получения соединения (I). Из 0,48 г (0,18 ммоль) Boc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Leu-Arg-Arg-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Cys(Acm)-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Arg-Ile-Gly-OH [1] и 0,19 г (0,18 ммоль) Boc-Ala-Gln-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH [2] получено 0,10 г 20% соединения (IV). R<sub>f</sub> 0,25 (Б).  $[\alpha]_D^{20} -45,4^\circ$  (с 1; 10% AcOH).

Биологические исследования *in vivo* проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 250—350 г. Крыс наркотизировали пнактином (1,2 мг/кг, внутривенно). Проводили трахеостомию, вводили полиэтиленовые катетеры в сонную артерию, яремную вену и мочевой пузырь. В течение опыта ректальную температуру животных поддерживали между 37,5 и 38° С. Артериальный катетер подключали к датчику

давления 23 Db (Statham, США). Артериальное давление и частоту сердечных сокращений регистрировали на самописце Linearcorder Mark VII (Watanabe, Япония). В яремную вену инфузирвали раствор 0,3% NaCl, 2% глюкозы в объеме 100 мкл/мин. На фоне стабильного мочеотделения собирали две контрольные и, после введения вещества, три опытные 10-минутные пробы мочи.  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в пробах мочи определяли на атомно-эмиссионном спектроанализаторе. Тестируемые ANP растворяли в 100 мкл инфузируемого раствора и вводили внутривенно в течение 1 мин. На каждом животном тестировали только одну дозу пептида, повторных введений ANP не производили.

Периферическое сосудорасширяющее действие ANP оценивали на изолированных кольцах грудного отдела аорты крыс линии Вистар. Четыре кольца аорты от одной крысы помещали в термостатируемые ячейки с раствором Кребса ( $37^\circ\text{C}$ , газовая смесь 95%  $\text{O}_2$  и 5%  $\text{CO}_2$ ) и после периода уравнивания (2 ч) с нагрузкой 1 г на фоне сокращения сосудов, вызванных субмаксимальной концентрацией простагландина  $\text{F}_{2\alpha}$  (10 или 30 мМ), вводили ANP и получали кумулятивные кривые зависимости эффекта от концентрации. На основании полученных данных строили график зависимости доза — эффект и определяли показатель  $\text{IC}_{50}$  — концентрацию ANP, вызывающую расслабление тонизированных простагландином  $\text{F}_{2\alpha}$  сосудов на 50%. Пептиды вводили в объемах не более 25 мкл на 10 мл раствора Кребса.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного и непарного критерия Стьюдента  $t$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников М. В., Беспалова Ж. Д., Молокоедов А. С., Ревенко И. В., Сепетов Н. Ф., Исакова О. Л., Титов М. И. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 759—767.
2. Овчинников М. В., Беспалова Ж. Д., Молокоедов А. С., Ревенко И. В., Сепетов Н. Ф., Исакова О. Л., Титов М. И. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 768—776.
3. Veber D. F., Milkowski J. D., Denkwalter R. G., Hirschmann R. // Tetrahedron Lett. 1968. № 26. P. 3057—3058.
4. Thibault G., Garcia R., Cantin M., Seidah N., Lazure C., Chretien M. Eur. Patent № 0140731, Bulletin 85/19, 08.05.1985.
5. Thibault G., Garcia R., Carrier F., Seidah N. G., Chretien M., Cantin M., Genest J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 125. № 3. P. 938—946.
6. Garcia R., Thibault G., Seidah N. G., Cantin M., Genest J., Chretien M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 126. № 1. P. 178—184.
7. Genest J. // British Heart J. 1986. V. 56. № 4. P. 302—316.
8. Wakitani K., Oshima T., Loewy A. D., Holmberg S. W., Cole B. R., Adams S. P., Fok K. F., Gurrie M. C. // Circul. Res. 1985. V. 56. № 4. P. 621—627.
9. Jonson M. D. // Life Sci. 1985. V. 38. № 3. P. 225—231.

Поступила в редакцию  
20.X.1987

После доработки  
23.XII.1987

#### ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDES. III. SYNTHESIS AND STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF $\alpha$ -r-ANF, APII, APIII AND des-SER<sup>5</sup>,SER<sup>6</sup>-APII

OVCHEVNIKOV M. V., BESPALOVA Z. D., MOLOKOEDOV A. S.,  
TITOV M. I., REVENKO I. V., VINOGRADOV V. A.,  
KOROBOV N. V., ZHUKOVSKY S. V.

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

A series of atrial natriuretic peptides, viz.,  $\alpha$ -r-ANF, APII, APIII, and des-Ser<sup>5</sup>, Ser<sup>6</sup>-APII, have been obtained by condensation of earlier synthesized fragments promoted with complex F. Acetylaminomethyl protecting group were removed from cystein residues with simultaneous cyclization of the peptide. Biological activity of the atrial natriuretic peptides was studied.