

Относительная сосудорасширяющая активность атриопептинов

Пептид	pD_2 *	Число опытов	Относительная активность **
Серия 1			
α -r-ANP	$8,72 \pm 0,12$	14	1,5
des-Ser ^{5,6} -AP-II	$7,29 \pm 0,15$	8	1,05
(III)	$8,55 \pm 0,24$	7	1,0
Серия 2			
(III)	$9,29 \pm 0,20$	7	1,0
(IX)	$8,85 \pm 0,12$	13	0,4
(XV)	$8,30 \pm 0,16$	6	0,1
(XX)	$8,09 \pm 0,07$	6	0,06

* pD_2 — отрицательный десятичный логарифм EC_{50} .** Различия достоверны при $p < 0,01$ по сравнению с эффектом соединения (III). Относительная активность рассчитывалась по отношению к активности соединения (III), выраженной как EC_{50} (EC_{50} — концентрация, вызывающая 50% эффекта от эффекта природного соединения).

Таблица 2

Влияние атриопептинов на диурез, экскрецию натрия и калия у наркотизированных крыс *

Пептид	Доза, мкг/кг	Число животных	Исходный уровень			Увеличение выделения		
			диуреза, мл/10 мин	натрия	калия	мочи, мл/10 мин	натрия	калия
				мкМ/10 мин			мкМ/10 мин	
AP-II	4	5	$0,8 \pm 0,2$	$28,0 \pm 7,5$	$9,4 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,2$	79 ± 25	$5,9 \pm 1,0$
AP-III	4	6	$1,6 \pm 0,1$	$5,0 \pm 1,8$	$3,3 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,2$	85 ± 32	$11,4 \pm 2,5$
α -r-ANP	4	5	$1,4 \pm 0,2$	$6,5 \pm 2,9$	$4,5 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,3$	109 ± 21	$19,1 \pm 4,1$
des-Ser ^{5,6} -AP-II	32	9	$0,7 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,1$	$7,9 \pm 2,3$	$3,1 \pm 1,0$
(III)	4	5	$1,2 \pm 0,4$	$9,5 \pm 6,9$	$22,9 \pm 12,9$	$0,8 \pm 0,4$	80 ± 29	$12,0 \pm 0,5$
(IX)	4	5	$0,9 \pm 0,2$	$21,2 \pm 8,6$	$37,6 \pm 8,5$	$0,8 \pm 0,3$	130 ± 36	$15,1 \pm 9,9$
(XV)	4	5	$1,4 \pm 0,3$	$9,7 \pm 4,5$	$16,7 \pm 5,2$	$1,2 \pm 0,2$	83 ± 14	$13,5 \pm 3,5$

* Данные представлены в виде средних величин со стандартной ошибкой.

уретической активности, кроме пептида des-Ser^{5,6}-AP-II, оказывавшего слабое диуретическое и натрийуретическое действие.

При изучении гипотензивных свойств атриопептинов и их аналогов было показано, что укорачивание аминокислотной последовательности пептида в ряду ANP, AP-III, AP-II, des-Ser^{5,6}-AP-II приводит к снижению активности [3]. Однако пептид des-Ser^{5,6}-[Mnp⁷]AP-II (III), также состоящий из 21 аминокислотного остатка, превосходил по активности AP-II и не уступал AP-III. Аналоги des-Ser^{5,6}-[Mnp⁷]AP-II с D-аминокислотами в C-концевой части уступали ему по гипотензивной активности.

Таким образом, осуществлен синтез четырех новых аналогов атриопептинов. Показано, что соединения des-Ser^{5,6}-[Mnp⁷]AP-II (III) не уступает по основным видам биологической активности более длинным пептидам AP-II и AP-III, в то время как его аналоги (IX, XV и XX) с остатками D-аминокислот в C-концевой части молекулы менее активны.

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 : 1 : 6 : 7,5 (В); этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 45 : 20 : 6 : 11 (Г); *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 : 2 (Д). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидрина или хлор-бензидинового реагента.

Гидрирование пептидов осуществляли в присутствии 10% Pd/C (Fluka или Merck) в количестве 5—10% от веса пептидов. Приведенные температуры плавления (не скорректированы) измеряли на приборе Voetius (ФРГ).

Удельное вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer (США). 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). Цистеин не определяли.

Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на приборе Altex 334 с детектором Altex 160 (214 нм) с использованием колонки (4,6 × 250 мм) Spherisorb ODS (5 мкм). Для разделения применяли градиент ацетонитрила в 0,05 М KH_2PO_4 (рН 3,0). Скорость элюции 1 мл/мин.

Индивидуальность полученных соединений подтверждена методом протонного магнитного резонанса. ^1H -ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker WM-500 (ФРГ) с рабочей частотой 500 МГц при 27° С. Образцы для спектров готовили растворением 1 мг соединения в 0,5 мл диметилсульфоксида- d_6 . Химические сдвиги в спектрах ПМР измеряли относительно внутреннего стандарта 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоната натрия. Отнесение сигналов в спектрах сделано с помощью двойного резонанса.

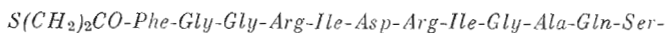
Растворы упаривали на роторном испарителе при 40° С. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40—100 (ЧСФР).

2. *Act-S-(CH₂)₂-CO-Phe-Gly-Gly-OH (I)*. 0,42 г (1 ммоль) Z-Phe-Gly-Gly-OH [2] гидрировали 5 ч в 10 мл метанола в присутствии Pd/C. К реакционной смеси добавляли 0,5 мл (1 ммоль) 40% раствора тритона В в метаноле, катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 10 мл DMF и прибавляли 0,30 г (1 ммоль) *p*-нитрофенилового эфира S-ацетамидометилмеркаптопропионовой кислоты. Реакционную смесь выдерживали 15 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в 40 мл воды, дважды экстрагировали эфиром, водную фракцию подкисляли 2% серной кислотой до рН 2, экстрагировали этилацетатом. Органическую фракцию промывали водой до нейтральной реакции, сушили сульфатом натрия и упаривали. После кристаллизации из смеси этилацетат — гексан получено 0,30 г (68%) соединения (I) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D -15,6^\circ$ (с 1; DMF); R_f 0,71 (А), 0,21 (В), 0,49 (Г).

Act-S-(CH₂)₂-CO-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp(OBu^t)-Arg-Ile-Gly-OH (II). К раствору 0,21 г (0,48 ммоль) соединения (I) в 5 мл DMF добавляли 0,10 г (0,64 ммоль) HONB, охлаждали до -30° С и при перемешивании добавляли 0,10 г (0,50 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при -10° С, 2 ч при 4° С, 10 ч при 20° С. Выпавшую *N,N'*-дициклогексимочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали, оставшееся масло растворяли в 30 мл этилацетата и осаждали гексаном. Выпавший осадок отфильтровывали, переосаждали из изопропилового спирта эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе, растворяли в 3 мл DMF.

К полученному раствору добавляли 0,38 г (0,50 ммоль) H-Arg-Ile-Asp(OBu^t)-Arg-Ile-Gly-OH [2]. Реакционную смесь перемешивали 5 ч при 20° С, добавляли 100 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, экстрагировали горячим этилацетатом, отфильтровывали, сушили в вакуум-эксикаторе. Получено 0,54 г (80%) соедине-

ния (II) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D -19,2^\circ$ (c 1; DMF); R_f 0,63 (A), 0,18 (B), 0,56 (B).



Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-OH (III).

а) 0,30 г (0,25 ммоль) Boc-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys(Asm)-Asn-Ser-Phe-Arg-OH [1] обрабатывали 1 ч 5 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь упаривали, оставшееся масло обрабатывали эфиром, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 20 мл воды и обрабатывали ионообменной смолой в OH^- -форме. Смолу отфильтровывали, промывали на фильтре водой, объединенные фильтраты упаривали досуха, остаток растирали с эфиром, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе.

б) 0,36 г (0,25 ммоль) соединения (II) суспендировали в 3 мл DMF, добавляли 0,08 г (0,50 ммоль) бромгидрата пиридина, полученный раствор охлаждали до $0^\circ C$ и при перемешивании добавляли 0,19 г (0,25 ммоль) комплекса «F». Реакционную смесь перемешивали 1 ч при $0^\circ C$, 6 ч при $20^\circ C$. Выпавшую N,N' -дициклогексилмочевину отфильтровывали, раствор 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 по способу «а». Реакционную смесь перемешивали 1 ч при $20^\circ C$, добавляли 50 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе. Полученный продукт обрабатывали 1 ч трифторуксусной кислотой, к реакционной смеси добавляли 70 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 20 мл воды и подвергали препаративной очистке методом ВЭЖХ на колонке (1,6 × 25 см) Silasorb C-18 (Chemapol, ЧСФР). Для разделения использовали градиент (0 → 100%) метанола в воде (оба растворителя содержали 0,02 моль ацетата триэтиламина, pH 4) за 50 мин. После обессоливания на той же колонке и лиофилизации получали 0,15 г линейного пептида.

Полученный лиофилизат растворяли в 20 мл 50% уксусной кислоты, к этому раствору добавляли 70 мл раствора вода в уксусной кислоте (концентрация 2,25 мг/мл). Полноту образования дисульфидной связи контролировали методом ВЭЖХ. К реакционной смеси добавляли 1,8 г цинковой пыли, 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 (0 → 100%) метанола в воде (оба растворителя содержали 0,1% трифторуксусной кислоты) за 30 мин. Фракции, содержащие циклический пептид, объединяли, упаривали, остаток растворяли в 30 мл воды и лиофилизировали. Получено 0,13 г (25%) соединения (III). R_f 0,22 (A), 0,28 (B). Аминокислотный состав: Asp 2,00 (2), Ser 1,92 (2), Glu 0,98 (1), Gly 5,00 (5), Ala 1,09 (1), Ile 1,75 (2), Leu 0,84 (1), Phe 2,14 (2), Arg 3,05 (3).

PMP (DMSO- d_6 , δ , м. д.): Mrp — 2,26 (2H, CH_2); Phe — 8,23 (1H, NH), 4,53 (1H, α -CH); Gly — 8,35 (1H, NH), 3,77 (1H, CH_2), 3,72 (1H, CH_2); Gly — 8,04 (1H, NH), 3,79 (1H, CH_2), 3,74 (1H, CH_2); Arg — 8,07 (1H, NH), 4,36 (1H, α -CH); Ile — 7,77 (1H, NH), 4,18 (1H, α -CH); Asp — 8,32 (1H, NH), 4,55 (1H, α -CH); Arg — 7,82 (1H, NH), 4,29 (1H, α -CH); Ile — 7,87 (1H, NH), 4,12 (1H, α -CH); Gly — 8,24 (1H, NH), 3,80 (1H, CH_2), 3,67 (1H, CH_2); Ala — 7,96 (1H, NH), 4,29 (1H, α -CH); Gln — 8,11 (1H, NH), 4,26 (1H, α -CH); Ser — 7,87 (1H, NH), 4,27 (1H, α -CH); Gly — 8,15 (1H, NH), 3,77 (2H, CH_2); Gly — 7,92 (1H, NH), 4,28 (1H, α -CH); Gly — 8,21 (1H, NH), 3,75 (2H, CH_2); Cys — 8,18 (1H, NH), 4,53 (1H, α -CH); Asn — 8,31 (1H, NH), 4,57 (1H, α -CH); Ser — 7,85 (1H, NH), 4,18 (1H,

α -CH); Phe — 8,25 (1H, NH), 4,49 (1H, α -CH); Arg — 8,11 (1H, NH), 4,20 (1H, α -CH).

Woc-D-Phe-Arg-OH (IV). К раствору 2,32 г (6 ммоль) *Woc-D-Phe-ONp* в 50 мл DMF прибавляли 0,87 г (5 ммоль) аргинина. Реакционную смесь перемешивали 15 ч при 20° С, упаривали до масла, растворяли в 10 мл хлороформа и делили на колонке (3 × 10 см) с силикагелем с использованием ступенчатого градиента хлороформ → метанол. Фракции, соответствующие главному продукту (контроль ТСХ), объединяли, упаривали и пересаждали из этилового спирта эфиром. Получали 1,76 г (84%) соединения (IV) с т. пл. 190—193° С. $[\alpha]_D^{20} +29,1^\circ$ (*c* 0,9; DMF); R_f 0,84 (A), 0,64 (B), 0,59 (B).

Z-Ser(Bu^t)-D-Phe-Arg-OH (V). 1,26 г (3 ммоль) соединения (IV) выдерживали 1 ч в 30 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь упаривали, остаток обрабатывали 100 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 100 мл смеси метанол — вода (1 : 1) и обрабатывали дауэксом в OH⁻ форме до pH 10. Смолу отфильтровывали, промывали на фильтре водой, фильтрат упаривали, сушили с изопропиловым спиртом. Остаток растворяли в 30 мл DMF, к полученному раствору добавляли 1,32 г (3 ммоль) *Z-Ser(Bu^t)-ONB*. Реакционную смесь перемешивали 20 ч при 20° С, упаривали, остаток промывали водой и упаривали с изопропиловым спиртом. Остаток растворяли в метаноле, осаждали эфиром. Получали 0,59 г (86%) соединения (V) с т. пл. 127—130° С. $[\alpha]_D^{20} +12,6^\circ$ (*c* 1; DMF); R_f 0,62 (A), 0,65 (B), 0,64 (B).

Z-Asn-Ser(Bu^t)-D-Phe-Arg-OH (VI). 0,21 г (0,35 ммоль) соединения (V) гидрировали в 30 мл MeOH в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 25 мл DMF и к полученному раствору добавляли 0,134 г (0,35 ммоль) *Z-Asn-ONp*. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в 10 мл хлороформа и делили на колонке (2,5 × 10 см) с силикагелем с использованием ступенчатого градиента хлороформ — метанол. Фракции, соответствующие главному продукту (контроль ТСХ), объединяли, упаривали и пересаждали из метанола эфиром. Получали 0,19 г (76%) соединения (VI) с т. пл. 141—144° С. $[\alpha]_D^{20} +11,2^\circ$ (*c* 1; DMF); R_f 0,64 (A), 0,58 (B), 0,62 (B).

Woc-Cys(Acm)-Asn-Ser(Bu^t)-D-Phe-Arg-OH (VII). 0,17 г (0,24 ммоль) соединения (VI) гидрировали и обрабатывали как описано выше. Полученное соединение растворяли в 20 мл DMF и к этому раствору добавляли 0,1 г (0,239 ммоль) *Woc-Cys(Acm)-ONp*. Через 15 ч реакционную смесь упаривали до небольшого объема, остаток растворяли в хлороформе и делили на колонке (3 × 10 см) с силикагелем. Фракции, соответствующие главному продукту (контроль ТСХ), объединяли, упаривали и пересаждали из метанола эфиром. Получали 0,17 г (83,7%) соединения (VII) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D^{20} +60^\circ$ (*c* 0,2; DMF); R_f 0,6 (A), 0,34 (B), 0,54 (B), 0,53 (Г).

Woc-Ala-Gln-Ser(Bu^t)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Asn-Ser-D-Phe-Arg (VIII). а) 1,56 г (2 ммоль) *Woc-Ala-Gln-Ser(Bu^t)-Gly-Leu-Gly-OBzl* [1] гидрировали в 70 мл DMF в присутствии Pd/C. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали до объема 30 мл и добавляли 0,465 г (2,6 ммоль) HONB. Охлаждали до —25° С и при перемешивании приливали охлажденный до —25° С раствор 0,46 г (2,2 ммоль) DCC в DMF. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при —10° С, 1 ч при 4° С и 15 ч при 20° С. Выпавшую N,N'-дидицилгексилмочевину отфильтровывали, фильтрат упаривали до небольшого объема, остаток обрабатывали 150 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе. Получали 1,58 г (93%) *Woc-Ala-Gln-Ser(Bu^t)-Gly-Leu-Gly-ONB* (VIIIa).

б) 0,07 г (0,082 ммоль) соединения (VII) обрабатывали 1 ч 10 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь упаривали, к остатку добавляли эфир, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили, растворяли в 10 мл воды и обрабатывали дауэксом в OH⁻ форме до pH 10. Смолу отфильтровывали, промывали на фильтре водой, метанолом.

Объединенные фильтраты упаривали с изопропиловым спиртом досуха, остаток растирали с эфиром, фильтровали, сушили. Остаток растворяли в 5 мл DMF и к этому раствору при перемешивании добавляли раствор 0,07 г (0,082 ммоль) соединения (VIIIa) в 5 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 15 ч при 20° С и осаждали эфиром. Получили 0,083 г (74%) соединения (VIII) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D -20^\circ$ (с 0,1; DMF); R_f 0,68 (A), 0,56 (B), 0,58 (B).

Mrp - Phe - Gly - Gly - Arg - Ile - Asp - Arg - Ile - Gly - Ala - Gln - Ser - Gly -

Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-D-Phe-Arg (IX) получали по методике, аналогичной для получения соединения (III), из 0,08 г (0,06 ммоль) соединения (VIII) и 0,071 г (0,06 ммоль) соединения (II). Выход после очистки методом препаративной ВЭЖХ и лиофилизации 0,06 г (64%). R_f 0,40 (B), 0,38 (D). Аминокислотный состав: Asp 1,92 (2), Ser 1,9 (2), Glu 0,96 (1), Gly 5,0 (5), Ala 1,1 (1), Ile 1,82 (1), Leu 0,9 (1), Phe 2,2 (2), Arg 3,1 (3).

ПМР (DMSO- d_6 , δ , м. д.): Phe — 4,54 (1H, α -CH); Gly — 8,36 (1H, NH), 3,77 (1H, CH₂), 3,72 (1H, CH₂); Gly — 8,15 (1H, NH), 3,79 (1H, CH₂), 3,74 (1H, CH₂); Arg — 8,07 (1H, NH), 4,33 (1H, α -CH); Ile — 7,77 (1H, NH), 4,18 (1H, α -CH); Asp — 8,33 (1H, NH); Arg — 7,82 (1H, NH), 4,29 (1H, α -CH); Ile — 7,86 (1H, NH), 4,12 (1H, α -CH); Gly — 8,24 (1H, NH), 3,80 (1H, CH₂), 3,67 (1H, CH₂); Ala — 7,96 (1H, NH), 4,29 (1H, α -CH); Gln — 8,11 (1H, NH), 4,26 (1H, α -CH); Ser — 7,87 (1H, NH), 4,27 (1H, α -CH); Gly — 8,15 (1H, NH); Leu — 7,72 (1H, NH), 4,28 (1H, α -CH); Gly — 8,21 (1H, NH); Cys — 8,18 (1H, NH), 4,52 (1H, α -CH); Asn — 8,31 (1H, NH), 4,59 (1H, α -CH); Ser — 7,82 (1H, NH), 4,18 (1H, α -CH); D-Phe — 8,12 (1H, NH), 4,53 (1H, α -CH); Arg — 8,16 (1H, NH), 4,20 (1H, α -CH).

Z-Phe-D-Arg-OH (X) получали по методике, аналогичной для получения соединения (IV), из 2,11 г (5 ммоль) *Z-Phe-ONp* и 0,87 г (5 ммоль) *H-D-Arg-OH*. Выход 2,17 г (95,3%), т. пл. 127—129° С. $[\alpha]_D -32^\circ$ (с 1; DMF); R_f 0,73 (A), 0,54 (B), 0,56 (B).

Z-Ser(Bu^t)-Phe-D-Arg-OH (XI). 1 г (2,2 ммоль) соединения (X) гидрировали как описано для соединения (VI). Полученное соединение растворяли в 10 мл DMF и к этому раствору добавляли 1 г (2,2 ммоль) *Z-Ser(Bu^t)-ONB*. Реакционную смесь перемешивали 18 ч при 20° С, упаривали до масла, остаток растворяли в 5 мл хлороформа и делили на колонке (3 × 10 см) с силикагелем с использованием ступенчатого градиента хлороформа → метанол. Фракции, соответствующие главному продукту (контроль ТСХ), объединяли, упаривали и переосаждали из метанола эфиром. Получали 1,13 г (86%) соединения (XI) с т. пл. 121—123° С, $[\alpha]_D -17,6^\circ$ (с 1; DMF); R_f 0,84 (A), 0,59 (B), 0,63 (B).

Z-Asn-Ser(Bu^t)-Phe-D-Arg-OH (XII) получали по методике, аналогичной для получения соединения (VI), из 1 г (1,67 ммоль) соединения (XI) и 0,65 г (1,67 ммоль) *Z-Asn-ONp*. После переосаждения из этанола эфиром получено 0,63 г (53%) соединения (XII) с т. пл. 144—146° С. $[\alpha]_D -36,7^\circ$ (с 1; DMF); R_f 0,65 (A), 0,46 (B), 0,58 (B).

Woc-Cys(Acm)-Asn-Ser(Bu^t)-Phe-D-Arg-OH (XIII) получали по методике, аналогичной для получения соединения (VII), из 0,5 г (0,7 ммоль) соединения (XII) и 0,29 г (0,7 ммоль) *Woc-Cys(Acm)-ONp*. Получили 0,46 г (77%) соединения (XIII) с т. пл. 147—150° С, $[\alpha]_D -45,2^\circ$ (с 1; DMF); R_f 0,71 (A), 0,41 (B), 0,57 (B).

Woc-Ala-Gln-Ser(Bu^t)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-D-Arg (XIV) получали по методике, аналогичной для получения соединения (VIII), из 0,2 г (0,23 ммоль) соединения (XIII) и 0,21 г (0,24 ммоль) соединения (VIIIa). После переосаждения из DMF эфиром получали 0,29 г (91,5%) соединения (XIV) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D -40,2^\circ$ (с 0,3; DMF — вода, 4 : 1); R_f 0,51 (A), 0,54 (B), 0,56 (B).

Mrp-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-

Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-D-Arg-OH (XV) получали по методике, аналогичной для получения соединения (III), из 0,091 г (0,067 ммоль) соединения

(XIV) и 0,08 г (0,067 ммоль) соединения (II). После очистки методом ВЭЖХ и лиофилизации получали 0,039 г (26%) соединений (XV). R_f 0,40 (B), 0,36 (B). Аминокислотный состав: Asp 1,89 (2), Ser 1,91 (2), Glu 0,87 (1), Gly 5,0 (5,0), Ala 1,05 (1), Ile 1,90 (2), Leu 0,93 (1), Phe 2,05 (2), Arg 3,2 (3). ПМР (DMSO- d_6 , δ , м. д.): Mrp — 2,46 (2H, CH₂); Phe — 8,23 (1H, NH), 4,53 (1H, α -CH); Gly — 8,35 (1H, NH), 3,72 (1H, CH₂), 3,77 (1H, CH₂); Gly — 8,01 (1H, NH), 3,79 (1H, CH₂), 3,74 (1H, CH₂); Arg — 8,07 (1H, NH), 4,34 (1H, α -CH); Ile — 7,77 (1H, NH), 4,18 (1H, α -CH); Asp — 8,33 (1H, NH), 4,54 (1H, α -CH); Arg — 7,82 (1H, NH), 4,29 (1H, α -CH); Ile — 7,86 (1H, NH), 4,12 (1H, α -CH); Gly — 8,24 (1H, NH), 3,80 (1H, CH₂), 3,67 (1H, CH₂); Ala — 7,95 (1H, NH), 4,29 (1H, α -CH); Gln — 8,11 (1H, NH), 4,26 (1H, α -CH); Ser — 7,87 (1H, NH), 4,27 (1H, α -CH); Gly — 8,15 (1H, NH), 3,76 (1H, α -CH); Leu — 7,92 (1H, NH), 4,28 (1H, α -CH); Gly — 8,21 (1H, NH), 3,74 (1H, α -CH); Cys — 8,16 (1H, NH), 4,53 (1H, α -CH); Asn — 8,30 (1H, NH), 4,58 (1H, α -CH); Ser — 7,94 (1H, NH), 4,18 (1H, α -CH); Phe — 8,18 (1H, NH), 4,49 (1H, α -CH); D-Arg — 8,01 (1H, NH), 4,19 (1H, α -CH).

Вос-D-Ser(Bzl)-Phe-Arg-OH (XVI). 1 г (2,2 ммоль) Z-Phe-Arg-OH [1] гидрировали как описано для соединения (VI). Полученный продукт растворяли в 15 мл DMF и к этому раствору прибавляли 1 г (2,2 ммоль) Вос-D-Ser(Bzl)-ONB. Реакционную смесь перемешивали 15 ч при 20° С, упаривали до масла, остаток растворяли в 10 мл хлороформа и делили на колонке (3 × 10 см) с силикагелем с использованием ступенчатого градиента хлороформ → метанол. Фракции, соответствующие главному продукту (контроль ТСХ), объединяли и упаривали. Получали 0,98 г (75%) соединения (XVI) с т. пл. 167—169° С. $[\alpha]_D$ 1,6° (с 1; DMF); R_f 0,55 (A), 0,49 (B).

Z-Asn-D-Ser(Bzl)-Phe-D-Arg-OH (XVII). 0,3 г (0,5 ммоль) соединения (XVI) выдерживали 1 ч в 10 мл трифторуксусной кислоты и обрабатывали как описано для соединения (V). Полученное соединение растворяли в 5 мл DMF, к раствору добавляли 0,2 г (0,5 ммоль) Z-Asn-ONp. Реакционную смесь выдерживали 15 ч при 20° С, упаривали до масла, растворяли в 5 мл хлороформа и делили на колонке (3 × 10 см) с силикагелем с использованием ступенчатого градиента хлороформ → метанол. Фракции, соответствующие главному продукту (контроль ТСХ), объединяли, упаривали, пересаждали из этанола эфиром и сушили. Получали 0,30 г (80%) соединения (XVII) с т. пл. 133—136° С. $[\alpha]_D$ -6,0° (с 1; DMF); R_f 0,76 (A), 0,45 (B).

Вос-Cys(Acm)-Asn-D-Ser-Phe-Arg-OH (XVIII). 0,25 г (0,33 ммоль) соединения (XVII) растворяли в 10 мл трифторуксусной кислоты, через полученный раствор в течение 1 ч пропускали ток сухого бромистого водорода, упаривали, к остатку добавляли 40 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром, растворяли в 100 мл воды и обрабатывали дауксом в OH⁻-форме до отрицательной реакции на ионы брома. Смолу отфильтровывали, промывали на фильтре метанолом, водой, объединенные фильтраты упаривали с изопропиловым спиртом. Остаток растворяли в 10 мл DMF, к раствору добавляли 0,14 г (0,33 ммоль) Вос-Cys(Acm)-ONp. Реакционную смесь перемешивали 15 ч при 20° С и упаривали до масла. Остаток растворяли в 5 мл хлороформа и чистили на колонке с силикагелем (3 × 10 см) с использованием ступенчатого градиента хлороформ → метанол. Фракции, соответствующие главному продукту (контроль ТСХ), объединяли, упаривали и пересаждали из метанола эфиром. Получали 0,19 г (72%) соединения (XVIII) с т. пл. 151—154° С. $[\alpha]_D$ -13,5° (с 1; DMF); R_f 0,75 (A), 0,28 (B), 0,45 (B).

Вос-Ala-Gln-Ser(Bu^t)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Asn-D-Ser-Phe-Arg-OH (XIX) получали по методике, аналогичной для получения соединения (VIII), из 0,15 г (0,18 ммоль) соединения (VIIIa) и 0,14 г (0,18 ммоль) соединения (XVIII). После пересаживания из DMF эфиром получали 0,2 г (81,3%) соединения (XIX) в виде аморфного порошка с $[\alpha]_D$ -15,6° (с 0,6; DMF); R_f 0,66 (A), 0,34 (B), 0,54 (B).

Mrp-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-

Gly-Cys-Asn-D-Ser-Phe-Arg-OH (XX) получали по методике, аналогичной для получения соединения (III), из 0,09 г (0,067 ммоль) соединения (XIX) и 0,08 г (0,067 ммоль) соединения (II). После очистки методом ВЭЖХ и лиофилизации получали 0,037 г (24,5%) соединения (XX). R_f 0,40 (B), 0,39 (Д). Аминокислотный состав: Asp 1,93 (2), Ser 1,85 (2), Gly 0,90 (1), Gly 4,95 (5), Ala 1,02 (1), Ile 1,93 (2), Leu 0,95 (1), Phe 2,03 (2), Arg 3,1 (3). ПМР (DMSO- d_6 , δ , м. д.): Phe — 8,23 (1H, NH), 4,55 (1H, α -CH); Gly — 8,36 (1H, NH), 3,77 (1H, CH₂), 3,72 (1H, CH₂); Gly — 8,01 (1H, NH), 3,76 (1H, CH₂); Arg — 8,07 (1H, NH), 4,33 (1H, α -CH); Ile — 7,77 (1H, NH), 4,17 (1H, α -CH); Asp — 8,32 (1H, NH), 4,54 (1H, α -CH); Arg — 7,82 (1H, NH), 4,29 (1H, α -CH); Ile — 7,86 (1H, NH), 4,12 (1H, α -CH); Gly — 8,24 (1H, NH), 3,81 (1H, CH₂), 3,67 (1H, CH₂); Ala — 7,95 (1H, NH), 4,29 (1H, α -CH); Gln — 8,11 (1H, NH), 4,26 (1H, α -CH); Ser — 7,87 (1H, NH), 4,27 (1H, α -CH); Gly — 8,15 (1H, NH), 3,76 (2H, CH₂); Leu — 7,91 (1H, NH), 4,28 (1H, α -CH); Gly — 8,20 (1H, NH), 3,75 (2H, CH₂); Cys — 8,19 (1H, NH), 4,53 (1H, α -CH); Asn — 8,31 (1H, NH), 4,54 (1H, α -CH); D-Ser — 7,76 (1H, NH), 4,22 (1H, α -CH); Phe — 8,03 (1H, NH), 4,53 (1H, α -CH); Arg — 8,27 (1H, NH), 4,22 (1H, α -CH).

Биологические исследования *in vivo* и *in vitro* проводили как описано в сообщении [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овчинников М. В., Беспалова Ж. Д., Молокоедов А. С., Ревенко И. В., Сепетов Н. Ф., Исакова О. Л., Титов М. И. // Биоорганическая 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. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 768—782.
3. Овчинников М. В., Беспалова Ж. Д., Молокоедов А. С., Ревенко И. В., Виноградов В. А., Коробов Н. В., Жуковский С. В. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 777—782.
4. Tribault G., Garsia R., Carrier F., Siedah N. G., Gantin V., Genest J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 125. № 3. P. 938—946.
5. Adams S. P., Fok F., Tyoeng F. S. // Fed. Proc. 1985. V. 44. P. 695.
6. Song D. L., Madsen B., Chang J.-K., Peliman A. J. // Eur. J. Pharm. 1989. V. 160. P. 141—148.
7. Schiller P. W., Gantin M., Maziak L. A., Nguyen T. M.-D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 143. № 2. P. 499—505.
8. Schiller P. W., Maziak L., Nguyen T. M.-D., Gantin M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 131. № 3. P. 1056—1062.
9. Berman M. J., Pelton T. J., Cardin D. A., Blankenship D. T., Hassman C. F. // FEBS Lett. 1987. V. 220. № 1. P. 214—216.
10. Sakharov I. V., Dukhanina E. A., Ovchinnikov M. V., Bepalova Zh. D., Titov M. I. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1988. V. 151. № 1. P. 109—113.
11. Stefenson S. L., Kenny A. J. // Biochem. J. 1987. V. 243. P. 183—187.

Поступила в редакцию
5.XII.1990

После доработки
1.III.1991

M. V. OVCHINNIKOV, Z. D. BESPALOVA, S. V. ZHUKOVSKI,
N. F. SEPETOV, I. V. REVENKO

ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDES. IV. SYNTHESIS AND STUDY OF SHORT ANALOGUES

Cardiology Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

New analogues of atrial peptides of rat were synthesized by classical methods of peptide chemistry in solution. They contain a D-amino acid residue in the C-terminal part and a residue of mercaptopropionic acid in the N-terminal part of the molecule. Biological activity of the new analogues was studied.