



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 17 * № 10 * 1991

УДК 577.175.85'17

© 1991 г.

*М. В. Овчинников, Ж. Д. Беспалова, С. В. Жуковский,
Н. Ф. Сепетов, Н. В. Ревенко*

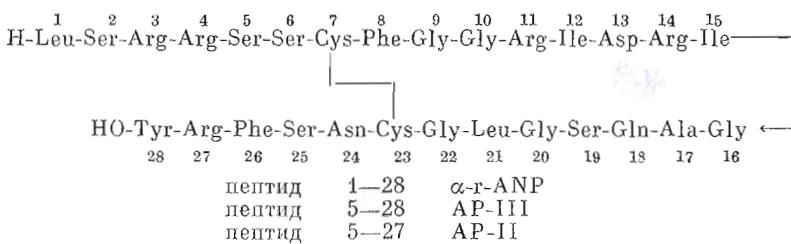
АТРИАЛЬНЫЕ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ IV. СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ УКОРОЧЕННЫХ АНАЛОГОВ

Всесоюзный кардиологический центр АМН СССР, Москва

Классическими методами пептидной химии в растворе синтезированы четыре аналого атриального натрийуретического пептида крысы, содержащих остаток меркаптоопионовой кислоты в N-концевой и D-аминокислоты в C-концевой частях молекулы. Проведена оценка их сравнительной биологической активности.

Поиск аналогов, сохраняющих основные виды биологической активности, более устойчивых к действию протеиназ и имеющих укороченную аминокислотную последовательность, является одним из основных направлений структурно-функциональных исследований пептидных гормонов.

В предыдущих сообщениях [1–3] мы описали химический синтез атриального натрийуретического пептида крысы — α -г-ANP (1–28) и его укороченных природных аналогов AP-III, AP-II, а также des-Ser^{5,6}-AP-II:



Общим структурным элементом всех атриальных пептидов является 17-членный цикл, образованный дисульфидной связью между остатками цистеинов в положениях 7 и 23. В соответствии с литературными данными [4, 5] аналоги α -г-ANP, укороченные с N-конца, обладают всеми видами биологической активности, присущими исходному пептиду, однако несколько уступают α -г-ANP. Среди них особенно интересны аналоги, содержащие β -меркаптоопионовую кислоту вместо Cys в положении 7 [6, 7]. Аналоги, укороченные с C-конца, имеют значительно меньшую активность, а разрушение циклической структуры приводит к практически полной потере всех видов активности [8].

Атриальные пептиды подвергаются быстрому расщеплению под действием протеиназ [9, 10]. Изучение деградации атриального натрийуретического пептида под действием эндопептидазы 24.11 [11] показало, что расщепление происходит в четырех местах, в том числе между остатками Cys⁷-Phe⁸ и Ser²⁵-Phe²⁶.

Цель настоящей работы — синтез укороченных аналогов α -г-ANP, содержащих остатки β -меркаптоопионовой кислоты (Mpr) вместо Cys⁷

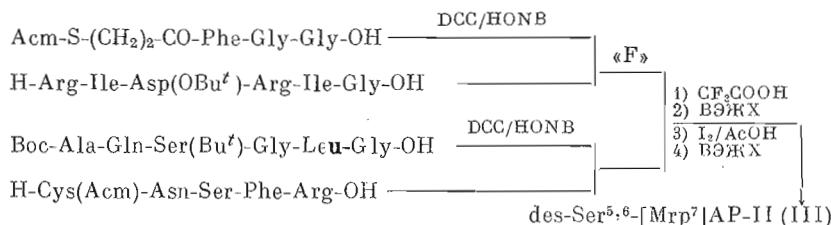
Сокращения: HONB — N-гидрокси-5-ноиборнен-2,3-дикарбоксимид, Np — n-нитрофенил, Acm — ацетамидометил, α -г-ANP — атриальный натрийуретический пептид крысы, AP-III — α -г-ANP (5–28)-пептид, AP-II — α -г-ANP(5–27)-пептид, Mpr — β -меркаптоопионовая кислота, «F» — комплекс трех молекул пентафторфенола с DCC.

и D-аминокислоты в положении 25, 26 или 27, а также изучение биологической активности этих аналогов.

Методами пептидной химии в растворе были синтезированы четыре аналого АР-II:

des-Ser ^{5,6} -[Mrp ⁷]AP-II	(III)
des-Ser ^{5,6} -[Mrp ⁷ , D-Arg ²⁷]AP-II	(XV)
des-Ser ^{5,6} -[Mrp ⁷ , D-Phe ²⁶]AP-II	(IX)
des-Ser ^{5,6} -[Mrp ⁷ , D-Ser ²⁵]AP-II	(XX)

Пептидные фрагменты последовательности 23—27, содержащие D-аминокислоты, были получены последовательным присоединением аминокислотных остатков, исходя из C-концевого аргинина (в виде свободного основания). Для конденсации использовались активированные эфиры аминокислот. Фрагмент Mrp(Acm)-Phe-Gly-Gly-OH также был получен последовательным наращиванием цепи. При этом карбоксильная функция глицина защищалась солеобразованием. Синтез остальных фрагментов был проведен так же, как в работах [1—3]. Активация фрагментов, способ и порядок их конденсации и выделения, а также замыкание дисульфидной связи и очистка конечных продуктов осуществлялись по ранее описанным методикам [1—3]. В качестве примера приводим схему синтеза соединения (III):



Полученные соединения были индивидуальны по данным ТСХ и ВЭЖХ, имели корректный аминокислотный анализ, их структура была подтверждена данными ПМР.

Сравнительная оценка биологической активности атриопептинов и их аналогов проводилась в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Периферическое сосудорасширяющее действие атриопептинов оценивали на изолированных кольцевых сегментах грудного отдела аорты самцов крыс линии Wistar. Было проведено две серии исследований.

Атриопептины в концентрациях 10⁻¹¹—10⁻⁶ М вызывали зависимое от концентрации расслабление тонизированных мезатоном колец аорты крыс. Показатели *pD*₂ (отрицательный десятичный логарифм EC₅₀) и относительная активность исследованных соединений представлены в табл. 1.

В первой серии экспериментов α-r-ANP и des-Ser^{5,6}-[Mrp⁷]AP-II (III) проявляли сходную активность, но значительно превосходили des-Ser^{5,6}-AP-II. Во второй серии активность пептида (III) и des-Ser^{5,6}-[Mrp⁷, D-Arg²⁷]AP-II (XV) значимо не различались, в то время как des-Ser^{5,6}, Mrp, D-Phe²⁶-AP-II (IX) и des-Ser^{5,6}-[Mrp⁷, D-Ser²⁵]AP-II (XX) существенно уступали des-Ser^{5,6}-[Mrp⁷]AP-II по сосудорасширяющей активности.

В опытах на изолированной коронарной артерии собаки, тонизированной простагландином F₂, сравнивалась активность ANP и des-Ser^{5,6}-[Mrp⁷]AP-II. Показатели EC₅₀ для этих соединений составляли 7,00 ± 0,19 (*n* = 9) и 6,75 ± 0,17 (*n* = 10) соответственно. Таким образом, активности ANP и des-Ser^{5,6}-[Mrp⁷]AP-II по влиянию на изолированную коронарную артерию собаки значимо не различались.

Объем мочеотделения и экскрецию электролитов с мочой исследовали на наркотизированных крысах (табл. 2). Исследованные атриопептины вызывали значительное увеличение экскреции Na⁺, диурез и экскреция K⁺ увеличивались незначительно. Экскреция Na⁺ и воды увеличивалась в первые 10 мин после введения пептида и возвращалась к исходному уровню в последующих пробах мочи.

Таким образом, в опытах на наркотизированных крысах исследованные атриопептины значимо не различались по диуретической и натрий-

Таблица 1

Относительная сосудорасширяющая активность атриопептинов

Пептид	pD_2^*	Число опытов	Относительная активность **
Серия 1			
α -r-ANP	8,72 ± 0,12	14	1,5
des-Ser ^{5,6} -AP-II (III)	7,29 ± 0,15 8,55 ± 0,24	8 7	1,05 1,0
Серия 2			
(III)	9,29 ± 0,20	7	1,0
(IX)	8,85 ± 0,12	13	0,4
(XV)	8,30 ± 0,16	6	0,1
(XX)	8,09 ± 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		
			диурез, мл/10 мин	натрия	калия	мочи, мл/10 мин	натрия	калия
				мкМ/10 мин	мкМ/10 мин		мкМ/10 мин	мкМ/10 мин
AP-II	4	5	0,8 ± 0,2	28,0 ± 7,5	9,4 ± 0,7	0,3 ± 0,2	79 ± 25	5,9 ± 1,0
AP-III	4	6	1,6 ± 0,1	5,0 ± 1,8	3,3 ± 0,7	0,5 ± 0,2	85 ± 32	11,4 ± 2,5
α -r-ANP	4	5	1,4 ± 0,2	6,5 ± 2,9	4,5 ± 0,8	1,2 ± 0,3	109 ± 21	19,1 ± 4,1
des-Ser ^{5,6} -AP-II (III)	32	9	0,7 ± 0,1	2,0 ± 0,6	2,9 ± 0,7	0,3 ± 0,1	7,9 ± 2,3	3,1 ± 1,0
(IX)	4	5	1,2 ± 0,4	9,5 ± 6,9	22,9 ± 12,9	0,8 ± 0,4	80 ± 29	12,0 ± 0,5
(XV)	4	5	0,9 ± 0,2	21,2 ± 8,6	37,6 ± 8,5	0,8 ± 0,3	130 ± 36	15,1 ± 9,9

* 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}-[Mrg⁷]AP-II (III), также состоящий из 21 аминокислотного остатка, превосходил по активности AP-II и не уступал AP-III. Аналоги des-Ser^{5,6}-[Mrg⁷]AP-II с D-аминокислотами в C-концевой части уступали ему по гипотензивной активности.

Таким образом, осуществлен синтез четырех новых аналогов атриопептинов. Показано, что соединение des-Ser^{5,6}-[Mrg⁷]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 пластинах 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 Boetius (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). Цистein 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 KН₂РО₄ (рН 3,0). Скорость элюции 1 мл/мин.

Индивидуальность полученных соединений подтверждена методом протонного магнитного резонанса. ¹Н-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.

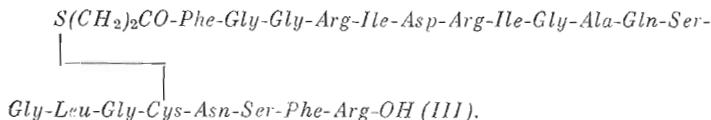
Растворы упаривали на роторном испарителе при 40° С. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40—100 (ЧСФР).

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) *n*-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).



а) 0,30 г (0,25 ммоль) Вос-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Asn-Ser-Phe-Arg-OH [1] обрабатывали 1 ч 5 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь упаривали, оставшееся масло обрабатывали эфиrom, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиrom, 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 эфиrom, образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали эфиrom, 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° С и при перемешивании добавляли 0,19 г (0,25 ммоль) комплекса «F». Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0° С, 6 ч при 20° С. Выпавшую N,N'-дициклогексимочевину отфильтровывали, раствор упаривали до небольшого объема и обрабатывали 40 мл смеси этилацетат — эфир (1 : 1). Выпавший осадок отфильтровывали, многократно промывали на фильтре эфиrom, сушили и растворяли в 3 мл DMF. К полученному раствору прибавляли продукт, полученный по способу «а». Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 20° С, добавляли 50 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре эфиrom, сушили в вакуум-эксикаторе. Полученный продукт обрабатывали 1 ч трифторуксусной кислотой, к реакционной смеси добавляли 70 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиrom, 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 иода 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 лиофилизовали. 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).

НМР (DMSO-d₆, δ, м. д.): Mrp — 2,26 (2H, CH₂); Phe — 8,23 (1H, NH), 4,53 (1H, α-CH); Gly — 8,35 (1H, NH), 3,77 (1H, CH₂), 3,72 (1H, CH₂); Gly — 8,01 (1H, NH), 3,79 (1H, CH₂), 3,74 (1H, CH₂); 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, 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 — 8,45 (1H, NH), 3,77 (2H, CH₂); Gly — 7,92 (1H, NH), 4,28 (1H, α-CH); Gly — 8,21 (1H, NH), 3,75 (2H, CH₂); 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).

Boc-D-Phe-Arg-OH (IV). К раствору 2,32 г (6 ммоль) *Boc-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 TCX), объединяли, упаривали и переосаждали из этилового спирта эфиром. Получали 1,76 г (84%) соединения (IV) с т. пл. 190—193° С. $[\alpha]_D +29,1^\circ$ (*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. $[\alpha]_D +12,6^\circ$ (*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 TCX), объединяли, упаривали и переосаждали из метанола эфиром. Получали 0,19 г (76%) соединения (VI) с т. пл. 141—144° С. $[\alpha]_D +11,2^\circ$ (*c* 1; DMF); R_f 0,64 (A), 0,58 (B), 0,62 (B).

Boc-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) *Boc-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 TCX), объединяли, упаривали и переосаждали из метанола эфиром. Получали 0,17 г (83,7%) соединения (VII) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D +60^\circ$ (*c* 0,2; DMF); R_f 0,6 (A), 0,34 (B), 0,54 (B), 0,53 (Г).

Boc-Ala-Gln-Ser(Bu^t)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Asn-Ser-D-Phe-Arg (VIII). а) 1,56 г (2 ммоль) *Boc-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. Выпавший N,N'-дициклогексимечевину 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%) *Boc-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 - 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 ($\text{DMSO}-d_6$, δ, м. д.): Phe — 4,54 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Gly — 8,36 (1H, NH), 3,77 (1H, CH_2), 3,72 (1H, CH_2); Gly — 8,15 (1H, NH), 3,79 (1H, CH_2), 3,74 (1H, CH_2); Arg — 8,07 (1H, NH), 4,33 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Ile — 7,77 (1H, NH), 4,18 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Asp — 8,33 (1H, NH); Arg — 7,82 (1H, NH), 4,29 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Ile — 7,86 (1H, NH), 4,12 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Gly — 8,24 (1H, NH), 3,80 (1H, CH_2), 3,67 (1H, CH_2); Ala — 7,96 (1H, NH), 4,29 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Gln — 8,11 (1H, NH), 4,26 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Ser — 7,87 (1H, NH), 4,27 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Gly — 8,15 (1H, NH); Leu — 7,72 (1H, NH), 4,28 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Gly — 8,21 (1H, NH); Cys — 8,18 (1H, NH), 4,52 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Asn — 8,31 (1H, NH), 4,59 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Ser — 7,82 (1H, NH), 4,18 (1H, $\alpha\text{-CH}$); D-Phe — 8,12 (1H, NH), 4,53 (1H, $\alpha\text{-CH}$); Arg — 8,16 (1H, NH), 4,20 (1H, $\alpha\text{-CH}$).

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 хлороформ → метанол. Фракции, соответствующие главному продукту (контроль TCX), 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).

Boc-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) Boc-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).

Boc-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 (XVI) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D = -40,2^\circ$ (с 0,3; DMF — вода, 1 : 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). НМР ($\text{DMSO}-d_6$, δ , м. д.): Mrp — 2,46 (2H, CH_2); Phe — 8,23 (1H, NH), 4,53 (1H, α -CH); Gly — 8,35 (1H, NH), 3,72 (1H, CH_2), 3,77 (1H, CH_2); Gly — 8,01 (1H, NH), 3,79 (1H, CH_2), 3,74 (1H, CH_2); 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, CH_2), 3,67 (1H, CH_2); 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).

Boc-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 TCX), 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 TCX), объединяли, упаривали, переосаждали из этанола эфиrom 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).

Boc-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 эфиrom, растворяли в 100 мл воды и обрабатывали дауэксом в OH[—]-форме до отрицательной реакции на ионы брома. Смolu 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 TCX), объединяли, упаривали и переосаждали из метанола эфиrom. 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).

Boc-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 пересаждения из DMF эфиrom 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 (В), 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 ($\text{DMSO}-d_6$, δ , м. д.): Phe — 8,23 (1H, NH), 4,55 (1H, α -CH); Gly — 8,36 (1H, NH), 3,77 (1H, CH_2), 3,72 (1H, CH_2); Gly — 8,01 (1H, NH), 3,76 (1H, CH_2); 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, CH_2), 3,67 (1H, CH_2); 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, CH_2); Leu — 7,91 (1H, NH), 4,28 (1H, α -CH); Gly — 8,20 (1H, NH), 3,75 (2H, CH_2); 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., Сенетов Н. Ф., Исакова О. Л., Титов М. И. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 759—767.
2. Овчинников М. В., Беспалова Ж. Д., Молокоедов А. С., Ревенко И. В., Сенетов Н. Ф., Исакова О. Л., Титов М. И. // Биоорган. 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. // Биоорган. 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., Bespalova 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.