〔19〕中华人民共和国专利局

〔51〕Int.Cl.⁴
C07K 7/04
A61K 37/02

〔12〕发明专利申请公开说明书

〔11〕CN 85 1 06564 A

〔43〕公开日 1987年3月18日

〔21〕申请号 85 1 06564
〔22〕申请日 85.8.31
〔71〕申请人 盐野义制药株式会社
地址 日本大阪府大阪市东区道修镇3丁目12番地
〔72〕发明人 木曾良明 中尾一和
〔74〕专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利代理部
代理人 顾柏棣 辛敏忠

〔54〕发明名称 制备与人a－心房肽有关多肽的方法

〔57〕摘要

一种由通式：R－Asn－Ser－Phe－Arg－Tyr－OH所表示的多肽，可用于原发性高血压临床诊断试剂的发展及其病理生理学研究。其中R为H，Cys，Gly－Cys，Leu－Gly－Cys，Gly－Leu－Gly－Cys，Ser－Gly－Leu－Gly－Cys，Gln－Ser－Gly－Leu－Gly－Gys，Ala－Gln－Ser－Gly－Leu－Gly－Cys，Gly－Ala－Gln－Ser－Gly－Leu－Gly－Gys或Ile－Gly－Ala－Gln－Ser－Gly－Leu－Gly－Cys及其盐。

242/87103121/20

CN 85 1 06564 A

权　利　要　求　书

1.制备由下式代表的多肽

R－Asn－ Ser－ Phe－Arg－Tyr－OH

其中R是

H，

Cys，

Gly－Cys，

Leu－Gly－Cys，

Gly－Leu－Gly－Cys，

Ser－Gyl－Leu－Gyl－Cys，

Gln－ Ser－Gly－Leu－Gyl－Cys，

Ala－Gln－ Ser－Gly－Leu－Gly－Cys，

Gly－Ala－Gln－ Ser－Gly－Leu－Gly－Cys，

或 Ile－Gly－Ala－Gln－ Ser－Gly－Leu－Gly－Cys，

及其盐类的方法，该方法包括，根据常规的肽合成方法，通过氨基酸与氨基酸之间，氨基酸与肽片段之间的逐步缩合，使肽链延长，每个氨基酸和肽片段均成为最终多肽的一部分，如果需要，还可进行对氨基酸和（或）肽片段的功能性基团进行保护及去保护。

制备与人 α- 心房肽有关多肽的方法

本发明涉及一类多肽，它们对于临床诊断试剂的发展和病理生理学的研究都是有用的。特别是这些多肽可用于病因诊断或用于原发性高血压这类心血管失调的病理生理学研究。

最近，Kangawa，Matsuo,等人分离出了一种多肽人 α- 心房肽（α-human Atrial Natriuretic Polypeptide= α-hANP］，它对人的心房有很强的钠尿效应，并确定了其结构由二十八个氨基酸组成，结构如下，［参考文献 Biochem. Biophs.Res. Comm. 118 131(1984)］：

5　　10

H—丝氨酸—亮—精—精—丝—丝—半胱—苯丙—甘—甘—精—甲硫

|

—— S— S—|

15　　20　　|

—天门冬—精—异亮—甘—丙—谷酰—丝—甘—亮—甘—半胱—天门冬酰

25

氨—丝—苯丙—精—酪—OH

据报导，用大鼠做生物测定 α-hANP的利尿效应相当于曾经被作为抗高血压的利尿剂广泛使用的furosemide的一千五百倍。虽然 α-hANP［下文有时用 α-hANP-(1-28) 表示］的一些小片段，例如，α-hANP-(7-28)［由N—末段的第七个到第二十八个氨基酸的多肽片段］，α-hANP-(13-28)，α-hANP-(18-28)已经商品化了，但它们的生理学效应和作为抗原的功能还没有报导。这些多肽其中 α-hANP-(18-28)是

N—末端谷氨酰胺环化的多肽，而且 α-h A N P-(18-28)N—末端谷氨酰胺末环化的还没有发现。

α-h A N P被认为是引起心血管疾病和原发性高血压的物质之一。本发明的目的是提供下列结构式所示的一些多肽：R—门冬酰胺—丝—苯丙—精—酪—OH，其中R是H，半胱，甘—半胱，亮—甘—半胱，甘—亮—甘—半胱，丝—甘—亮—甘—半胱，谷氨酰胺—丝—甘—亮—甘—半胱，丙—谷氨酰胺—丝—甘—亮—甘—半胱，甘—丙—谷氨酰胺—丝—甘—亮—甘—半胱，或者，异亮—甘—丙—谷氨酰胺—丝—甘—亮—甘—半胱，以及它们相应的盐，可用于制备 α-h A N P的抗血清，这些试剂可用于临床诊断心血管失调，或用于病理生理学的研究。

图1 所示 α-h A N P(1-28)的标准曲线（用●——● 表示），α-r A N P-(1-28) 的交叉曲线（用Δ—Δ表示），α-h A N P-(24-28)的交叉曲线（用○——○表示），纵轴表示抗原的结合百分比（^{125}碘标记 α-h A N P）（B）游离的抗原（F）而横轴表示 α- A N P的浓度（微微克/管）。

直到现在，高血压症被分成两大类，第一类与第二类高血压症。第二类高血压症主要伴随着肾脏病，内分泌疾病，怀孕，主动脉狭窄，中枢神经失调等等。另外，前者其中病因不明的作为原发性高血压症，并且80～90% 的高血压症都被划分到这一类。

就第二类高血压症来说，借助于治疗有原因的病症改善高血压症的状况是可能的，然而原发性高血压症的患者已经可以得到治疗，例如用抗高血压药物，即利尿剂、血管舒张剂，肾上腺能抑制因子。不过，上文提到的 α-h A N P最近认为是与心血管疾病和原发性高血压症有关的制剂之一，并且广泛开展了 α-h A N P对高血压症意义的研究。

本发明从两个方面继续发明家们的研究，阐明 α-h A N P在控制水和电解质平衡中的病理生理学意义和建立一个特别的测量 α-h A N P的方法用于诊断和估计包括原发性高血压症在内的心血管失调。

上文后提到的测定 α-h A N P其测定方法的建立所必须使用的抗血清就是由本发明提供的一系列多肽来制备的。更特别地，本发明涉及的多肽可用以下通式表示：

R- Asn- Ser- Phe- Arg- Tyr- OH （ I ）

式中R表示以下结构

H，

Cys，

Gly- Cys，

Leu- Gly- Cys，

Gly- Leu- Gly- Cys

Ser- Gly- Leu- Gly- Cys，

Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys

Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys，

Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys，

或 Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys

和它们相应的盐。

所有组成结构式（ I ）的氨基酸都是L—构型。以下的缩写都是根据理论与应用化学国际联合会和国际生化联合会（ I U P A C— I U B）的命名法而制定的。

Ala：丙氨酸

Arg：精氨酸

Asn：天门冬酰氨

Cys：半胱氨酸

Gln：谷氨酰胺

Gly：甘氨酸

Ile：异亮氨酸

Leu：亮氨酸

Phe：苯丙氨酸

Ser：丝氨酸

Tyr：酪氨酸

通式所表示本发明的多肽和它们相应的盐可根据通常的合成方法来延长多肽链。即：逐步地缩合氨基或将具有两个或几个氨基酸的片段缩合在一起，这两种步骤也可以混合使用。

两个氨基酸之间，氨基酸和多肽之间，多肽和多肽之间的缩合可根据普通的缩合方法进行，例如，叠氮化物法、混合酸酐法、二环己基碳化二亚胺（DCC）法、活化脂法（其中包括对硝基苯脂法、N—羟基丁二酰亚胺脂法、氰基甲基脂法等）、Woodward 试剂K方法、羰基二咪唑方法、氧化还原法。这些缩合反应可在液相或固相进行。就固相延长肽链方法而言，多肽的C—末端的氨基酸固定在不溶性的载体上。固相载体与氨基酸C—末端羧基形成的链当反应完成以后又很容易解离。例如：可以使用卤甲基树脂、氯甲基树脂、溴甲基树脂，羟基甲基树脂，氨基甲基树脂，二苯甲基树脂和叔烷基氧羰基酰肼树脂。

作为合成多肽的常规方法，要对氨基酸的 α—氨基，w—氨基和羧基根据情况需要进行保护和去保护。可用于保护氨基的基团举例如下：苄氧羰酰基（以下缩写为Z）、间氯苄氧羰酰基（Z(2- Cl)、对硝基苄氧羰酰基（Z(NO_2)、对甲氧基苄氧羰酰基（Z(OMe)、叔丁氧羰酰基（BOC）、叔戊氧羰酰基（Aoc）、异莰氧基羰酰基、金刚氧基羰酰基、(2-4-联苯)-2-丙氧基羰酰基（Bpoc）、9-芴氧基羰酰基（Fmoc）、甲基磺酰乙氧基羰酰基（Msc）、三氟乙酰、苯二甲酰、甲酰基、2-硝基苯基亚磺酰基（NPS）、二苯磷亚硫酰（Ppt）、二甲基磷基亚硫酰（Mpt）还包括以上基团的类似物。

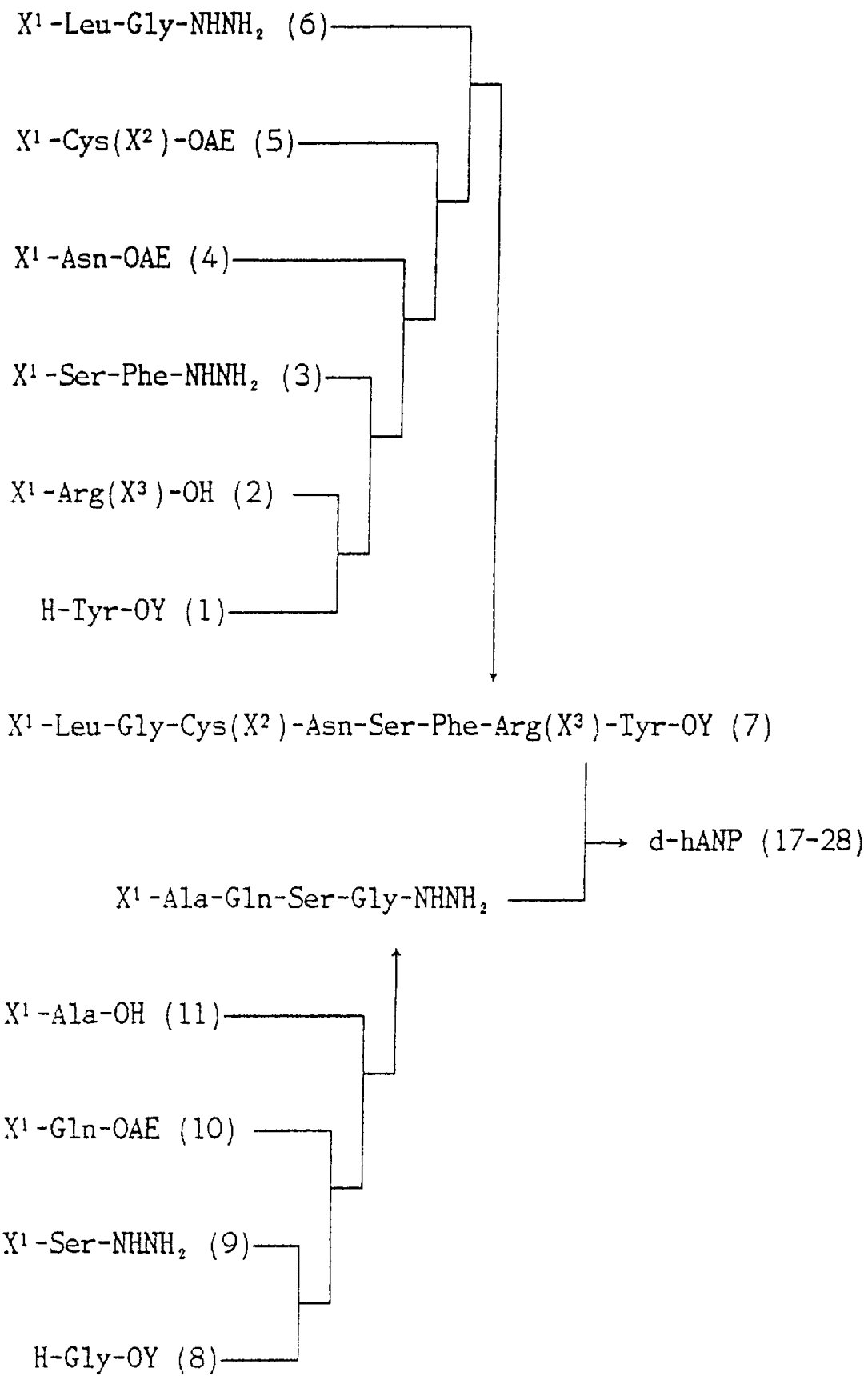
用于保护羧基的基团举例如下，苄基脂（OBzl）、4-硝基苄基脂

（ O Bzl（ NO_2））、叔丁基脂（ O But ）、4-吡啶基甲基脂（ O Pic）、和这些基团的类似物。必要时特殊氨基酸如精氨酸、半胱氨酸、丝氨酸，除氨基和羧基需保护外，其功能性基团也要用适当的保护基团保护。例如，精氨酸的胍基可用以下基团保护，如硝基、对甲苯磺酰基、苄氧羰酰基、金刚氧羰酰基、对甲氧基苯磺酰基、4-甲氧基-2,6- 二甲基苯磺酰基（ Mds ）、1,3,5-三甲基苯磺酰基（ Mts ）和上述基团的类似物。半胱氨酸的巯基可用以下基团保护：苄基、对甲基氧苄基、三苯甲基、乙基甲胺、氨基甲酸乙酯、4-甲基苄基、2,4,6-三甲基苄基（ Tmb）等。丝氨酸的羟基可用苄基，叔丁基、乙酰基、四氢吡喃基等保护。

下文将以本发明含有12个氨基酸的多肽 α-h A N P-(17-28)为例详细地叙述其制备过程。反应的程序表示如下。

反应程序

The reaction process



式中：X^1表示N—末端氨基酸的氨基保护基团

X^2表示巯基保护基团

X^3表示胍基保护基团，AE表示活化脂残基，Y表示C—末端氨基酸的羧基保护基团。

上述反应中，适合于氨基保护基团X的有Z-、Z(Cl)、Z(OMe)、Boc和它们的类似物，适合于羧基保护的基团Y有：-OBzl、OBzl(NO)和其类似物。Tmb可作为巯基的保护基X，Mts作为胍基的保护基X。

上述反应过程中，反应物(1)和反应物(2)的缩合反应，反应物(11)的引入是利用混合酸酐法进行的。本发明中常规的混合酸酐法合成肽可用以下例子表示：氨基和胍基都被保护的精氨酸(2)可用氯甲酸乙酯或氯甲酸异丁脂进行酐化反应。成酐反应通常在低温最好在-15 ℃到-5℃进行约10分钟。反应物(1)的酐化反应通常在肽合成溶剂中进行，例如：二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)、六甲基磷二酰胺(HMPA)、氯仿、二氯乙烷、四氢呋喃、二氧杂环己烷、乙酸乙酯和其它类似的溶剂。反应在低温进行需1-24小时(如冰浴)。从反应物(11)缩合到反应物(12)的缩合反应也是用同样的方法进行，此外，用反应物(12)的脂通过与肼的水合反应很容易得到肼化的反应物(12)。这种肼的形成反应还用于制备反应物(3)、(6)和(9)。

缩合反应按活性脂方法进行，例如：(1)、(2)、(3)、(4)的缩合就是利用活化脂完成的，对硝基苯脂、2,4-二硝基苯脂、2,3,4,5,6-五氯苯脂、2,4,5-三氯苯脂、2,3,4,5,6-五氟苯脂、N—羟基丁二脂亚胺脂、或其同系物。

缩合反应在上文所提到的肽合成溶剂中并在低温或加热进行，最适反应温度为-20 ℃到-40 ℃。尽管反应还取决于其它因素，但反应时间通常

取1-24小时。反应物(5)和反应物(10)的缩合反应也使用这些反应条件。

反应物(3)、(6)、(12)的缩合反应使用叠氮法。叠氮基可利用各自的肼化物经库尔修斯(Curtius)法(Organic Reaction, Vol.3 p.337)即在酸性溶液中与硝酸钠反应而制成，也可利用Rudinger方法(参见Collect. Czech. Chem. Commun. ,26,2333(1961))，即使用硝化烷基(如硝化异戊烷)在无水溶剂中反应来制备。所形成的叠氮与相应的多肽发生缩合的反应通常在低温进行(从-10 ℃到+10 ℃),反应体系中含有化学数量的碱。最好使用有机碱，如：三乙基胺、三丁基胺、二异丙基乙基胺，二甲基苯胺、吡啶、皮考啉、N-甲基吗啉和其类似物。上文所提到的肽合成溶剂可作为溶剂适当选择使用。在进行上述各种反应之前必须除去氨基的保护基团X^1。例如，苄氧羰酰基型的保护基团(Z. Z(2Cl)，Z(NO_2)、Z(OMe)可用氟化氢、三氟乙酸等也可用钯催化加氢将其除去。

其它功能基团的保护基直到最后步骤才经过一步或逐步反应被除去。例如，Z(OMe)保护的丙氨酸、Tmb保护的半胱氨酸、Mts保护的精氨酸和Bzl保护的酪氨酸都可在二甲基亚砜存在条件下，与氟化氢反应脱掉保护基团。以下举例说明。

每一步反应的中间产物和终产物都可利用肽研究领域的常规方法分离纯化，如抽取，重结晶，层析(凝胶过滤、离子交换，分配层析、吸附、或反相层析),电泳，逆流分配。

上面通式(Ⅰ)所表示的肽类〔但不是α-hANP-(17-28)〕都可以根据上述方法合成。通式(Ⅰ)表示的肽类的盐可以是具有有机酸或无机酸的盐，举例如下，盐酸盐，氢溴酸盐，硝酸盐，硫酸盐，乙酸盐，马来酸盐，甲酸盐，乳酸盐，酒石酸盐，丁二酸盐和柠檬酸盐。金属盐可以是钠盐、钾盐、钙盐和铵盐或胺盐如三乙基胺盐。

本发明目的化合物的制备程序举例说明如下，本发明却不仅局限于这

些例子。

以下实施例中保护基团的缩写表示如下：

Z(OMe)：　对甲氧基苄氧羰酰基

ONp：　对硝基苯氧基

Bzl：　苄基

Z：　苄氧羰酰基

Mts：　1,3,5-三甲基苯磺酰基

（二甲叉磺酰基）

Tmb：　2,4,6-三甲基苄基

实施例1：

α-h A N P-(17-28)的制备

(1) Z(OMe)- Arg(Mts)- Tyr- O Bzl

在20ml含有Z(OMe)- Arg(Mts)- OH（由10.0g(16.1mmol）环己胺盐制取）和异丁基氯甲酰盐的二甲基甲酰胺（以下缩写DM F）的混合酸酐反应溶液，加入冰冷的50ml含有H- Tyr- O Bzl（由8.25g(19.3 mmol）相应的甲苯磺酸盐制取的DM F溶液，然后在冰浴上搅拌三小时。减压蒸发除去溶剂得到油状残留物，将其溶解于乙酸乙酯，用0.5 N盐酸和氯化钠的水溶液洗，然后蒸发干燥残留物破碎成粉末，样品经过4.5 × 25厘米的硅胶柱层析用氯仿：甲醇(10 ：0.5)的溶剂系统洗脱，洗脱物经乙酸乙酯/ 醚重结晶得到11.5克目的化合物，产率92% ，熔点98-102℃。[α]$_D$ -3.2° (C=0.9，DM F，20℃),薄层层析(T L C)(Kieselg e160 F 245，Merck，下文使用同样的吸附剂)：Rf_2=0.73(溶剂系统：氯仿/ 甲醇/ 乙酸(9∶1 ∶0.5)，以下Rf_2这术语表示同样的意义]：Rf_3=0.28[溶剂系统：氯仿/ 甲醇(10 ∶0.5)以下Rf_3表示同样的意义。]

$C_{40}H_{47}N_5O_9S_1$ 的分析

理论值(%) C62.08，H6.12， N9.05，

实验值(％) C62.19, H6.16, N8.66,

三氟乙酸(以下缩写为TFA)/苯甲醚(10ml/2.8ml)加到5.0克(6.46mmole)的Z(OMe)-Arg(Mts)-Tyr-OBzl中，混合物冰浴60分钟，然后减压蒸发除去三氟乙酸，残留物用正已烷洗，减压条件下用氢氧化钾(以下简写KOH)颗粒干燥3小时，溶于含有0.9毫升(6.46mmol)三乙基胺的DMF中。将一种由3.34克(7.75mm)Z(OMe)-Ser-Phe-$NHNH_2$的DMF溶液[该溶液用2.59毫升(18.6mm)三乙基胺中和]所制备的叠氮化合物溶液在冰冷条件下加到上述溶液中，混合物在5℃搅拌14小时后浓缩。剩余物用与上述同样的抽提方法纯化，再经过一个硅胶柱(3.5×20cm)层析，并用氯仿/甲醇(20∶0.5)溶剂系统洗脱。洗脱物经乙酸乙酯/醚重结晶即得到4.85克(76％的产率)本项化合物(2),熔点98-100℃, $[\alpha]_D$ -5.1°(C=0.6, DMF, 20℃)

TLC: Rf_1=0.67

溶剂系统为：氯仿/甲醇/水(8∶3∶1)，以后Rf_1，即代表同样的意义]

$C_{52}H_{61}N_7O_{12}S$ 的分析

理论值(％) C61.95, H6.10, N9.37,

实验值(％) C62.03, H6.08, N9.67,

(3) Z(OMe)-Asn-Ser-Phe-Ary-(Mts)-Tyr-OBzl

通过上述步骤2所得到的被保护的四肽酯用按上述同样方法用TFA/苯甲醚(10ml/2.4ml)处理，在减压的条件下用KOH颗粒干燥3小时，然后溶于20毫升DMF中，向该溶液中加入0.62毫升(4.46mmol)三乙胺，2.05克(4.91mmol)Z(OMe)-Asn-ONp及0.49毫升(4.46mmol)N—甲基吗啉(以后简写为NMM),然后将混合物搅拌14小时，用醋酸中和，蒸发。剩余物在乙醚/水中捣碎并研成粉状。加入乙醇将粉末从DMF中沉淀出来即得到3.95克(79％的产率)本项化合物(3)。

熔点171-173 ℃ $[\alpha]_D$ -15.0° (C=0.6 DMF ,20℃),

TLC: Rf_1 =0.63

$C_{56}H_{67}NO_9S_{14}$ 的分析

理论值(%) C59.93, H6.02, N11.23

实验值(%) C59.79, H6.08, N11.14

(4) Z(OMe)- Cys(Tmb)-OH

在冰浴中将含有4.91克(23.7mmol)Z(OMe)-N_3的25毫升四氢呋喃(以下简称THF)溶液加到含有5 克(19.7mm)H- Cys(Tmb)-OH的25毫升水溶液中，该水溶液含有6 毫升(43.3mmol)三乙基胺。反应混合物在5 ℃搅拌过夜后，用乙醚洗，水层用5 % 的柠檬酸中和，得到的沉淀抽干成粉状，此粉末再经过DMF/ 乙醚重结晶即得到4.95克(56.% 的产率)的本项化合物(4)。熔点为153-158 ℃ $[\alpha]_D$ -37.5° (C=0.6, DMF, 20℃)

TLC: Rf_1 =0.56

$C_{22}H_{27}NO_5S$ 的分析

理论值(%) C63.29, H6.25, N3.36

实验值(%) C63.49, H6.54, N3.41

(5) Z(OMe)- Cys(Tmb)-ONp

向含有5 克(12.0mm)Z(OMe)- Cys(Tmb)-OH及1.83克(13.2mmol)邻氮苯酚的50毫升THF溶液中加入2.72克(13.2mmol)二环已基碳化二亚胺(以后简写为DCC)。混合物在室温搅拌过夜，过滤，将滤液浓缩，产物再经DMF/2- 丙醇结晶纯化即得到3.56克(55 % 的产率)的本项化合物(5)。

熔点:121℃ , $[\alpha]_D$ -25.5°(C=1.0, DMF, 20℃)

TLC: Rf_5=0.71 [溶剂系统为氯仿，以后Rf_5都代表这个意义]

$C_{28}H_{30}N_2O_7S$ 的分析

理论值(%) C62.44, H5.61, N5.20

实验值(%) C62.40, H5.61, N5.20

(6) Z(OMe)-Cys(Tmb)-Asn-Ser-Phe-Arg(Mts)-Tyr-OBzl

按常规方法将2.0克(1.78mmol)Z(OMe)-Asn-Ser-Phe-Arg(Mts)-Tyr-OBzl用TFA/苯甲醚(4ml/1ml)处理，然后将无水乙醚加到混合物中即得到粉状产物。经氢氧化钾颗粒减压干燥3小时后，将这些粉末与0.23毫升(1.78mmol)三乙胺，1.06克(1.96mmol)Z(OMe)-Cys(Tmb)-ONp及0.20毫升(1.78mmol)NNM共同溶解在20毫升DMF中。溶液搅拌14小时后用乙酸中和、蒸发，剩余物在水中捣碎得到的粉末用DMF-乙醇沉淀，即得到2.01克(83%的产率)的本项化合物(6)。

熔点:200-203℃ $[\alpha]_D$ -200° (C=0.8, DMF, 20℃)

TLC: Rf_1=0.51

$C_{69}H_{84}N_{10}O_{15}S_2$ 的分析

理论值(%) C61.04, H6.24, N10.32

实验值(%) C60.85, H6.40, N10.03

(7) Z(OMe)-Leu-Gly--$NHNH_2$

向含有7.02克(19.7mm)Z(OMe)-Leu-Gly--OMe的30毫升甲醇溶液中加入5.90毫升(98.5mmol)80%的水合肼。混合物置室温反应24小时，蒸发。剩余物加入水/乙醚结晶。结晶物再用甲醇/乙醚重结晶。即得到5.79克(83%产率)的本项化合物(7)。熔点108-112℃ $[\alpha]_D$ -6.0° (C=0.7, DMF, 20℃)

$C_{17}H_{26}N_4O_5$ 的分析

理论值(%) C55.72, H7.15, N15.29

实验值(%) C55.74, H7.15, N15.20

(8) Z(OMe)-Leu-Gly-Cys(Tmb)-Asn-Ser-Phe-Arg(Mts)-Tyr-OBzl

向2.01克(1.48mmol)Z(OMe)-Cys(Tmb)-Asn-Ser-Phe-Arg(Mts)-Tyr-OBzl中加入TFA/苯甲醚(4.0ml/1.0ml),混合物按常规方法在0 ℃反应1小时,蒸发除去TFA,剩余物在乙醚中捣碎制成粉状物。这些粉末经过滤收集、干燥即为H-Cys(Tmb)-Asn-Ser-Phe-Ary(Mts)-Tyr-OBzl·TFA。将粉末溶于含0.21毫升三乙胺的DMF中,在冰冷条件下,向上述浓度中加入一种由三乙胺中和的叠氮溶液。这种叠氮溶液是由用0.28毫升(2.14mmol)亚硝酸异戊酯/3.2M-HCl/DMF(0.28ml/1.34ml)在DMF中处理的0.65克(1.78mmol)Z(OMe)-Leu-Gly-$NHNH_2$所制备得到的。上述反应混合物在5 ℃搅拌14小时后浓缩,并向剩余物中加入水。产物在DMF/乙醇中结晶而得到2.06毫克(91%的产率)本项化合物(8)。熔点210-212 ℃ $[\alpha]_D$ -11.4°(C=0.7, DMF, 20 ℃)。TLC: Rf_1=0.56

$C_{77}H_{98}N_{12}O_{17}S_2$ 的分析

理论值(%) C60.53, H6.47, N11.00

实验值(%) C60.29, H6.69, N10.85

(9) Z(OMe)-Ser-Gly-OBzl

将7.0克(24.7mmol)Z(OMe)-Ser-$NHNH_2$按常规方法与3.94毫升亚硝酸异戊酯/18.6毫升3.2当量HCl-DMF于10毫升DMF中反应,然后用8.26毫升三乙基胺中和,这样制备的叠氮化合物溶液,与9.51克(29.6mmol)H-Gly-OBzl.甲苯磺酸盐,并用4.11毫升三乙基胺中和的30毫升DMF溶液在冰冷条件下在5 ℃反应14小时,反应混合物经浓缩得到的油状物溶解在乙酸乙酯中。该溶液用0.5当量的盐酸,5%的碳酸氢钠及饱和氯化钠水溶液洗,在硫酸钠中干燥,蒸发剩余物加入乙醚结晶,

结晶产物再在THF/乙醚中重结晶即得到6.89克(67%的产率)本项化合物(9)。熔点95-97℃ $[\alpha]_D$ +3.0°(C=0.7, DMF,20℃)。TLC: Rf_1=0.89, Rf_3=0.33,

$C_{21}H_{24}N_2O_7$ 的分析

理论值(%) C60.57, H5.81, N6.73

实验值(%) C60.67, H5.78, N6.84

(10) Z(OMe)-Gln-Ser-Gly-OBzl

用TFA/苯甲醚(10ml/2.6ml)处理5克(12.0mmol)Z(OMe)-Ser-Gly-OBzl以除去保护基团。产物溶于20毫升DMF,得到的溶液用3.34毫升(24.0mmol)三乙基胺中和,然后加入5.69克(13.2mmol)Z(OMe)-Gln-ONp,该混合物搅拌14小时后浓缩,得到的固体产物用10%柠檬酸和水洗,并在DMF/甲醇中重结晶即得到5.04克(77%的产率)的本项化合物(10)。熔点198-200℃。 $[\alpha]_D$ +3.9°(C=0.5, DMF,20℃), TLC: Rf_1=0.12,

$C_{26}H_{32}N_4O_9$ 的分析

理论值(%) C57.34, H5.92, N10.29

实验值(%) C57.31, H5.98, N10.43

(11) Z(OMe)-Ala-Gln-Ser-Gly-OBzl

按上述操作所获得的3克三肽按常规方法用TFA/苯甲醚(6.0ml/1.8ml)处理去保护,产物溶于含0.77毫升(5.51mmol)的三乙基胺的30毫升DMF中,在冰浴中,将由1.67克(6.61mmol)Z(OMe)-Ala-OH和0945毫升(7.27mmol)氯甲酸异丁酯制成的混合酸酐溶液加到上述溶液中,混合物在冰浴中搅拌3小时,蒸发除去溶剂,从加水的剩余物中沉淀出固体产物过滤收集。在DMF/乙醇中重结晶即得到2.72克(80%的产率)的本项化合物(11)。熔点:105-107℃ $[\alpha]_D$ -3.6°(C=0.8, DMF, 20℃), TLC: Rf_1=0.62

$C_{29}H_{37}N_5O_{10}$ 的分析

理论值(%) C56.57, H6.06, N11.38

实验值(%) C56.71, H6.10, N11.58

(12) Z(OMe)-Ala-Gln-Ser-Gly-$NHNH_2$

将上述过程制备的2.72克(4.42mmol)保护的四肽酯溶于30毫升DMF溶液中，再加入1.3毫升(5当量)80%的水合肼，将混合物反应24小时，蒸发除去溶剂后得到的粉状物用乙醇洗，并用二甲基亚砜(以后简称DMSO)-DMF(1∶1)/乙醇重结晶即得到2.29克(96%的产率)的本项化合物(12)。熔点216-218℃。 $[\alpha]_D$ -19.1°(C=0.7, DMSO, 20℃), TLC: Rf_1=0.21

用6当量盐酸水解后产物的氨基酸组成(%)

Ser 0.90, Glu 1.02, Gly 1.00, Ala 1.02(谷氨酸的回收率为89%)

$C_{22}H_{33}N_7O_9$ 的分析

理论值(%) C48.97, H6.17, N18.17

实验值(%) C48.67, H6.38, N18.17

(13) Z(OMe)-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys(Tmb)-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OBzl [Z(OMe)-(hANP 17-18)-OBzl]

用TFA苯甲醚(4ml/1ml)与2.06克(1.35mmol)Z(OMe)-Leu-Gly-Cys(Tmb)-Asn-Ser-Phe-Arg(Mts)-Tyr-OBzl在0℃反应60分钟。TFA在室温蒸发除去，其余产物加入无水乙醇即得到H-Leu-Gly-Cys-(Tmb)-Asn-Ser-Phe-Arg(Mts)-Tyr OBzl·TFA的粉末状沉淀。产物过滤收集，在KOH颗粒中减压干燥3小时，然后溶于10毫升含有0.19毫升(1.35mmol)三乙胺的DMF中。

另一方面，1.09克(2.03mmol)Z(OMe)-Ala-Gln-Ser-Gly

- $NHNH_2$溶于10毫升DMF- DMSO(1∶1)中，并依次向溶液中加入1.22毫升(4.87 mmol)4当量盐酸/ DMF及0.32毫升(2.44mmol)亚硝酸异戊酯。混合物在低温下反应，并用0.68毫升(4.87mmol)三乙基胺中和即得到相应的叠氮化合物。将该叠氮化合物在冰浴中逐滴加到上述8 肽的DMF溶液中，混合物在5 ℃搅拌过夜，用茚三酮反应阴性确定后，反应混合物用50毫升水稀释，得到粉状沉淀过滤收集，干燥，用DMF/90 % 甲醇重结晶即获得本项化合物(13)。熔点242-244 ℃，[$\alpha]_D$ -7.1°(C=0.6，DMSO，20℃)，TLC: Rf_4=0.85 [溶剂系统为正丁醇/ 吡啶/ 乙酸/ 水(4∶1 ∶1 ∶2)

用6 当量盐酸水解后产物的氨基酸组成(%)

Asp 1.03，Ser 1.90，Glu 1.21，Gly 2.17，Ala 1.17，Cys 0.66，Leu 0.98，Tyr 0.97，Phe 1.00，Arg 1.03(苯丙氨酸回收率为97%)

$C_{90}H_{119}N_{17}O_{23}S_2$ 的分析

理论值(%) C57.77，H6.41，N12.73

实验值(%) C57.56，H6.48，N12.51

(14) H- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys(SH7- Asn- Ser- Phe- Arg- Tyr- OH[α-hANP-(17-28)].

向上述过程所获得的100 毫克(53.4 μmol)Z(OMe)-[α-hANP-(17-28)] - OBzl中加入280 微升(2.67 μmol)间甲酚，197 微升(2.67 μmol)二甲基硫醚和2 毫升氟化氢，该混合物在0 ℃处理1 小时后，0 ℃蒸发除去氟化氢，其余产物加入乙醚，所得的粉状物离心，溶于2 毫升含有82毫克(10 当量) 的二巯基苏糖醇的水溶液，加入氨水调至PH8.0，混合物在氩气流条件下搅拌30分钟，反应混合物通过 Sephadex G-25柱(Pharmacia AB)(1.8 ×140cm，用0.2 N醋酸洗脱，每组分体积7毫升) 层析纯化。洗脱液冰冻干燥即得到23毫克(33 % 产率) 的本项化合物(14)。[$\alpha]_D$ -10.0°(C=0.1，0.2N乙酸，30℃)，TLC: Rf_4=0.37用

6 N HCl 水解后产物氨基酸组成：Asp 0.98, Ser 1.85, Glu1.03, Gly 2.02, Ala 1.09, Cy SH 1.36, Leu 0.99, Tyr 0.78, Phe1.00, Arg 0.97(苯丙氨酸回收率为92%)。

实施例2

α-h A N P(24-28)的合成

向上述实施例1-(3)步骤中所获得的93毫克保护为5肽中加入87微升(0.827mmol)间甲酚，59微升(0.829mmol)二甲基硫醚及2毫升氟化氢，该混合物在0℃反应1小时后，在0℃蒸发除去氟化氢，剩余物按实施例1中的第14步骤处理即得到34毫升α-h A N P-(24-28)[H- Asn- Ser- Phe- Ary- Tyr- OH]。

实施例3

H- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys(SH)-Asn- Ser- Phe- Arg- Tyr- OH[α-h A N P-(15-28)的合成。

500毫克(0.267mmol) Z-(OMe)- Ala- Gln- Ser- Gly- Cys(Tmb)-Asn- Ser- Phe- Arg(Mts)-Tyr- O Bzl与0.23毫升(2.14mmol)苯甲醚及2毫升三氟乙酸在0℃反应1小时后，蒸发除去三氟乙酸，其余反应物加入乙醚制成粉状，得到的颗粒过滤收集，干燥即得到去保护的产物即H- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys(Tmb)- Asn- Ser- Phe- Arg(Mts)-Tyr- O Bzl · T F A。该产物作为三氟乙酸盐，其Z(OMe)已去除。

同时，将127毫克Z(OMe)- Ile- Gly- $NHNH_2$与5毫升DMF、280微升4当量- HCl/DMF，55微升亚硝酸异戊酯和116微升三乙基胺反应得到相应的叠氮化物。该叠氮化物在冰浴中逐滴加到在DMSO- DMF(1∶1)中的上述去保护产物，混合物搅拌过夜。反应混合物加入水后过滤收集，干燥得到固态物质，再经DMF/甲醇重结晶进一步纯

化即得到433 毫克所需的 α-h A N P-(15-28)，即是Z(OMe)- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys(Tmb)-Asn- Ser - Phe- Arg(Mts)-Tyr- O Bzl。T L C: Rf_1=0.47 。

用6 当量盐酸水解的产物氨基酸组成:

Asp 1.00(1), Ser 1.83(2), Gln 1.21(1), Cystein 0.60(1), Gly 3.46(3), Ala 1.24(1), Ile 1.07(1), Leu 1.20(1), Tyr0.92 (1), Phe 1.00(1), Arg 0.92(1) (苯丙氨酸回收率为63%) 。

上述去保护的 α-h A N P-(15-28)(100mg,0.049mmol) 在257 微升间 - 甲酚中，用180 微升(2.45mmol)甲基硫醚及2 毫升氟化氢0 ℃处理1 小时，氟化氢在0 ℃减压蒸发除去。剩余物加入乙醚制成粉状，得到的产物溶于含75毫克的二巯基苏糖醇水溶液中，用5 % 的氨水调至 PH8.0,并在流动氩气中搅拌30分钟，反应产物经过 Sephadex G25(1.8×110cm) (Pharmacia A B) 柱层析，用0.2 N乙酸洗脱(每组分体积为6 毫升) 收集第30到37组分，冰冻干燥即得到化合物 α-h A N P-(15-28)，产率为 80% ，T L C: Rf_4=0.29

经下述实验确定，通过上述反应得到的多肽 α-h A N P-(n-28)(n 表示15到24的整数) 与 α-h A N P-(1-28) 一样对动物有抗原性，可用于 α -h A N P将异的放射免疫分析以阐明 α-h A N P在能力—控制系统中的病理生理学作用。

实验例1

将 α-h A N P-(17-28)与牛甲状腺球蛋白结合(一种复合物制剂)

α-h A N P-(17-28)通过碳化二亚胺偶联法(Yoshinase etal, J. Clin. Invest.69,643(1983), Nakao etak., Biochem, Biophys, Res. Commun. 117,695(1984)] 与牛甲状腺球蛋白结合。

将3 毫克 α-h A N P-(17-28)及25.2毫克牛甲状腺球蛋白溶于2 毫升蒸馏水中，然后加入含30毫克1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺氢

化物的溶液。混合物用盐酸调至 PH5.6,室温搅拌20小时。反应混合物在4 ℃用5 升蒸馏水中透析三次，即得到所需复合物。

免疫作用

将100-200 微克 α-h A N P-(15-28)- 甲状腺球蛋白复合物悬浮于等体积 Freund 氏完全佐剂中。

通过皮下注射，将悬液注射到日本白兔的肩胛骨脊椎区域，每4 周用免疫辅助剂处理一次，处理十到十四天后，收集其血液即得到抗血清 CR_3。

碘化标记

按常规的氯胺- T方法[Nature 194 495(1962)]，用1m Ci ^{125}I标记1 微克 α-h A N P-(1-28),反应混合物经过 Sep- Pak药筒(Waters Ltd) 用50% 乙腈/5m M三氟乙酸的混合物洗脱，得到的纯产品 ^{125}I标记的 α-h A N P放射性比活性为700 Ci/ g 。

放射免疫测定(R I A)

所用的R I A溶液为0.1 M的磷酸缓冲液，内含0.5 % 明胶，0.1mM E D T A · 2 Na，0.2m M胱氨酸，0.1 % Triton X-100及0.01% 的硫柳汞。

向100 微升 α-h A N P的标准溶液中加入100 微升抗血清 CR_3溶液(最终稀释度为1 ：4000),100 微升 ^{125}I- α-h A N P(约5,000 Cpm) 及200 微升R I A溶液，混合物在4 ℃保温72小时。

然后加入1 毫升有旋糖酐涂裹的活性炭悬液，这种活性炭是由300 毫克/100毫升活性炭(Norit S X Plus)，30毫克/100毫升右淀糖酐(Dextran T-70, Pharmalia A B),及1 毫升含0.01% 硫柳汞的0.05M磷酸缓冲液组成。混合物在4 ℃反应15分钟后，通过离心将结合的 ^{125}I- 标记的 α-h A N P与其游离形成的分开，并测量其放射性强度。

α-h A N P-(1-28) 的标准曲线及从大鼠心房分离出的 α-r A N P-(1-28)与合成肽段 α-h A N P-(24-28)的交叉曲线如图1 所示。在高灵敏度范围最小可测限度为50微微克。从图1 中清楚可见，由 α-h A N P-(17-28)所制备的抗血清 C.R3对于 α-h A N P-(1-28) 及 α-r A N P(1-28)具有同样的识别能力。另一方面，分子量换算表明， α-h A N P-(24-28)显示出与 α-h A N P-(1-28) 同样的活性。正如所预想的那样， R I A可以从狗、豚鼠、猴、牛、猪及羊的心房抽提物中检测到 α- A N P- L I。结果表明，上述R I A系统不仅可用来检测 α-h A N P，而且可用检测其它动物中的与A N P相关的肽。这个系统还可以用来检测天然的或合成的与 α- A N P相似而其氨基酸顺序尚未确定的肽类。

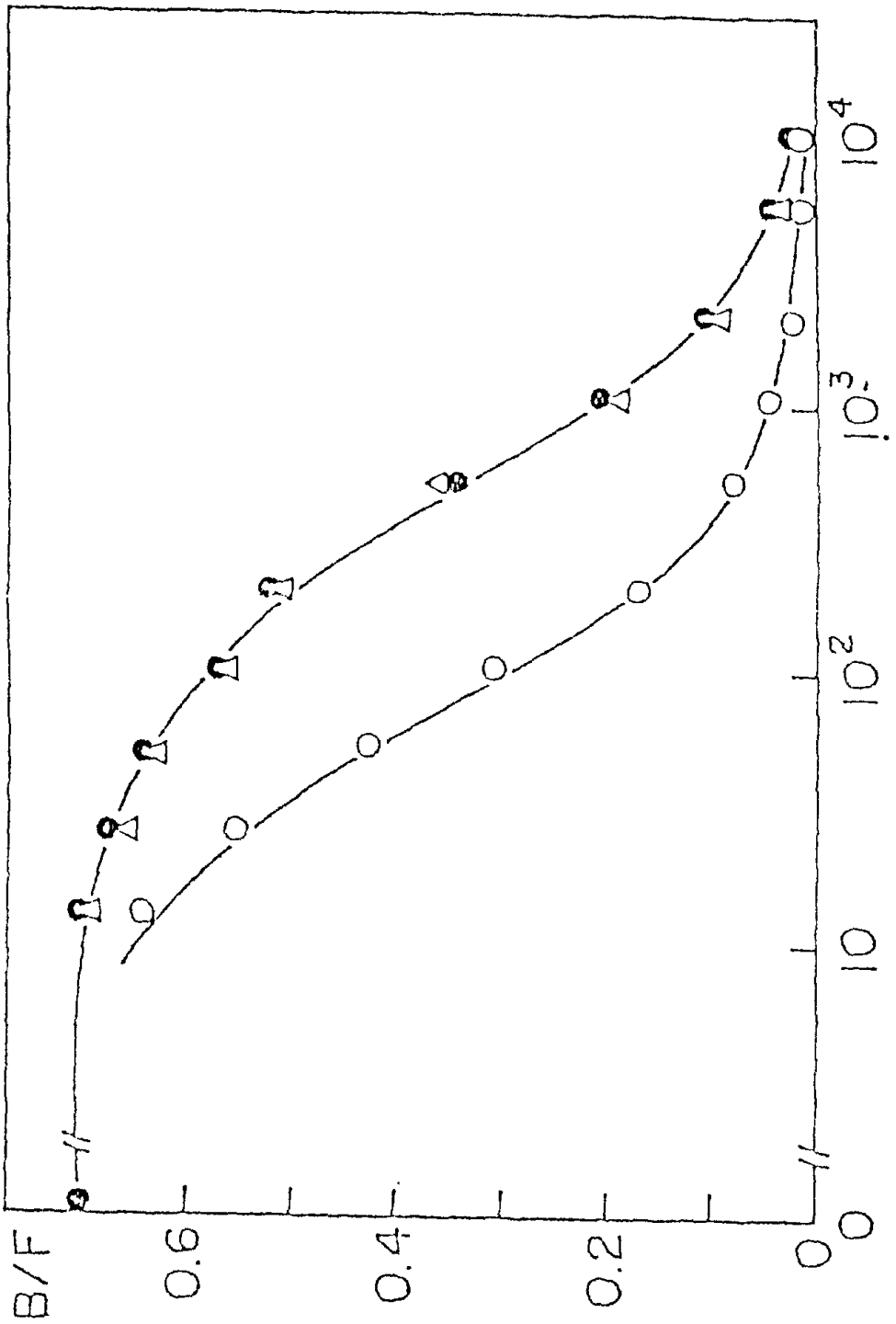


图 1