



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 18.07.78 (P. 208497)

Pierwszeństwo: 18.07.77 Węgry

Zgłoszenie ogłoszono: 02.07.79

Opis patentowy opublikowano: 27.02.1982

Int. Cl.² C07C 103/52

Twórca wynalazku _____

Uprawniony z patentu: Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt., Budapeszt
(Węgry)

Sposób wytwarzania nowych peptydów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych peptydów o ogólnym wzorze X-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Y, w którym X oznacza rodnik pochodzący z alifatycznego kwasu α -hydroksykarboksylowego, a Y oznacza rodnik pochodzący z alifatycznego kwasu α -aminokarboksylowego, oraz ich soli addycyjnych z kwasami i połączeń kompleksowych.

Rodnik X korzystnie oznacza grupę hydroksyacetylową lub α -hydroksypropionylową, natomiast Y korzystnie oznacza grupę leucylową, izoleucylową, alanylową lub treonylową.

Peptydy wytwarzane sposobem według wynalazku stanowią analogi angiotensyny II i wykazują działanie do niej antagonistyczne.

Angiotensyna II jest wytwarzanym w ustroju oktapeptydem odznaczającym się silnym działaniem podwyższającym ciśnienie tętnicze krwi. W ustroju powstaje najpierw angiotenzyna I przez działanie obecnego w nerkach enzymu proteolitycznego reniny na α -globulinę wytwarzaną w wątrobie. W warunkach normalnych angiotensyna I ulega przemianie enzymatycznej na oktapeptyd — angiotensynę II.

Pierwszy analog angiotensyny II opisano w 1970 roku. Stwierdzono, że związek ten działa jako specyficzny inhibitor angiotensyny II na zasadzie wypierania (konkurencji), zarówno w testach in vivo jak również in vitro (G. R. Mar-

2

shall et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **67**, 1624, (1970) P. A. Khairallah et al.: J. Med. Chem. **13**, 181 (1970).

5 Doniesienia powyższe spowodowały szerokie zainteresowanie tymi związkami i pociągnęły za sobą w wielu laboratoriach prace nad syntezą oraz badaniem nowych analogów angiotensyny II o działaniu antagonistycznym, dzięki któremu mogą być stosowane w celach diagnostycznych lub do leczenia nadciśnienia nerkowego. Już w początkowych pracach stwierdzono, że najbardziej obiecujące pod tym względem analogi uzyskuje się przez zastąpienie reszty 8-fenylalaninowej w łańcuchu angiotensyny II resztą alifatycznego aminokwasu. 15 Zastąpienie to powoduje zmianę właściwości peptydu z agonistycznych na antagonistyczne (D. Gagnon et al.: Bn J. Pharmacol. **43**, 409 (1971); D. T. Pals et al.: Circ. Res. **29**, 664, (1971).

20 Znaczne wzmocnienie działania antagonistycznego można uzyskać przez zastąpienie oprócz Phe⁸ również reszty Asp¹ resztą sarkozyny (D. T. Pals et al.: Circ. Res. **29**, 673 (1971). Otrzymana w ten sposób (Sar¹, Ala⁸) angiotensyna II jest już stosowana. Zalety tego związku związane są z mniejszym in vivo rozkładem enzymatycznym i dużym powinowactwem do punktów receptorowych.

Przypuszczenie, że antagonistyczne analogi angiotensyny II mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce oraz w niektórych przypadkach w lecze-

niu nadciśnienia nerkowego — (D. Ganten i F. Gross: *Med. Klin.* **71**, 2043, (1976); J. L. Marx: *Science*, **194**, 821, (1976); P. Needleman i G. R. Marshall: *Fed. Proc.* **35**, 2486, (1976 r.) zostało potwierdzone w badaniach klinicznych (H. R. Brunner et al.: *Lancet* 1045, (1973); A. J. M. Donker et al.: *Lancet*, 1535 (1974); T. Ogiwara et al.: *Lancet*, 219, (1974); J. H. Larach et al.: *New Engl. J. Med.*, **292**, 695 (1975); W. A. Pettinger et al.: *New Engl. J. Med.* **292**, 1214 (1975); D. H. P. Streeten et al.: *Circ. Res.* **36**, Suppl. 1, 125 (1975); H. R. Brunner i H. Gavras: *Schweitz. med. Wschr.* **106**, 1791 (1976).

Porównanie budowy i aktywności biologicznej otrzymanych dotychczas analogów angiotensyny II dostarczyło bardzo ważnych informacji dla interpretacji aktywności agonistyczno-antagonistycznej (M. C. Khosla et al.: *Handbook of Experimental Pharmacology*, tom 37 wydawnictwo I. H. Page i F. H. Bumpus 1974; G. R. Marshall: *Fed. Proc.* **35**, 2494 (1976).

Zadaniem wynalazku jest otrzymanie nowych antagonistów pozbawionych niepożądanych działań ubocznych i odznaczających się dłuższym biologicznym okresem półtrwania (M. C. Khosla et al.: *J. Med. Chem.* **19**, 224 (1976) i to sam 20, 253 (1977)).

Stwierdzono, że przy jednoczesnym zastąpieniu w cząsteczce angiotensyny II reszty 8-feniloalaninowej/ resztą alifatycznego kwasu α -aminokarboksyłowego i przyłączeniu w położeniu 1 alifatycznego kwasu α -hydroksykarboksylowego otrzymuje się nowe konkurencyjne inhibitory angiotensyny II, które w testach in vivo (nawet przy podaniu podskórnym) znacznie zmniejszają nadciśnienie wywołane przez angiotensynę II.

Sposób według wynalazku wytwarzania związków o ogólnym wzorze X-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Y, w którym Y i X mają wyżej określone znaczenie, polega na tym, że reaktywną pochodną heptapeptydu o ogólnym wzorze H-Arg(A)-Val-Tyr(B)-Ile-His(E)-Pro-Y-OG, w którym A oznacza grupę odpowiednią do okresowej ochrony grupy guanidynowej anginy, B oznacza grupę odpowiednią do okresowej ochrony aromatycznej grupy hydroksylowej tyroniny, E oznacza grupę odpowiednią do okresowej ochrony grupy imidazolowej histydyny, G oznacza grupę odpowiednią do ochrony grupy karboksylowej końcowego węgla alifatycznego aminokwasu, trwałą w łagodnie kwasowych warunkach ale odszczepialną przez silne kwasy lub zasady, albo na drodze uwodornienia katalitycznego, a Y ma wyżej określone znaczenie, poddaje się reakcji z reaktywną pochodną kwasu aminoksykarboksylowego o ogólnym wzorze W-X'-M, w którym X' oznacza grupę α -aminoaktylową pochodzącą z alifatycznego kwasu karboksylowego.

W oznacza grupę ochronną odszczepialną przez hydrolizę kwaśną lub katalityczne uwodornienie, a M oznacza grupę hydroksylową lub grupę aktywowującą, odszczepia się grupę ochronną E z otrzymanego związku o ogólnym wzorze W-X'-Arg(A)-Val-Tyr(B)-Ile-His(E)-Pro-Y-OG, w którym B, W,

X', Y, A, E i G mają wyżej określone znaczenia, a następnie pozostałe grupy ochronne łańcuchów bocznych i grup końcowych, przy czym te pozostałe grupy usuwa się przez uwodornienie katalityczne i ewentualnie przekształca tak otrzymany związek o ogólnym wzorze X-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Y- w sól addycyjną z kwasem lub w połączenie kompleksowe.

W związkach o ogólnym wzorze H-Arg(A)-Val-Tyr(B)-Ile-His(E)-Pro-Y-OG, A oznacza korzystnie grupę nitrową lub tosyłową, B oznacza korzystnie ewentualnie podstawioną grupę benzylową, a E oznacza korzystnie grupę dwunitrofenylową. W związkach wyjściowych o ogólnym wzorze W-X'-M, W oznacza korzystnie grupę benzyloksykarbonyłową lub III rz.-butoksykarbonyłową, X' oznacza korzystnie grupę aminoksyacetylową lub α -aminoksypropionylową, a M oznacza korzystnie grupę piwoiloksyłową, nitrofenoksyłową, pięciofluorofenoksyłową, N-sukcynimidoksyłową, azydową, 2,3,5-tróchlorofenoksyłową lub pięciochlorofenoksyłową.

Grupę ochronną E odszczepia się korzystnie za pomocą 2-merkaptetanolu, natomiast pozostałe grupy ochronne łańcuchów bocznych, grup końcowych usuwa się przez uwodornienie katalityczne. Oznacza to, że wszystkie grupy ochronne z wyjątkiem E można usunąć w jednym etapie. W wyniku usunięcia grupy aminowej w postaci amoniaku z N-końcowego α -aminoksykwasu otrzymuje się α -hydroksykwas. Ten sposób usuwania grupy aminowej z uwolnieniem α -hydroksykwasu jest tutaj przedstawiony po raz pierwszy.

Reaktywne pochodne heptapeptydu o ogólnym wzorze H-Arg(A)-Val-Tyr(B)-Ile-His(E)-Pro-Y-OG, stosowane jako związki wyjściowe w sposobie według wynalazku, można otrzymać metodami znanymi w chemii peptydów. Odpowiednia metoda jest opisana na przykład w węgierskim opisie patentowym nr 168431. Polega ona na tym, że grupy funkcyjne łańcuchów bocznych chroni się grupami trwałymi w warunkach kwaśnej hydrolizy prowadzonej przy eliminacji grupy ochronnej po sprzęganiu.

W korzystnej realizacji sposobu według wynalazku do okresowej ochrony grupy karboksylowej końcowego węgla aminokwasu stosuje się grupę p-nitrobenzylową (NB), grupę guanidynową arginy chroni się grupą nitrową, natomiast grupę hydroksylową tyrozyny chroni się grupą benzylową (Bzl), a grupę chroniącą pierścień imidazolowy histydyny stanowi grupa dwunitrofenylowa (Dnp).

Wszystkie te grupy ochronne są trwałe w środowisku słabo kwaśnym, zatem N-końcowa grupa t-butoksykarbonylowa (Boc) może być usunięta bez niebezpieczeństwa ich odszczepienia. Przedstawiona specjalna kombinacja grup ochronnych umożliwia usunięcie w pierwszym rzędzie grupy dwunitrofenylowej, a następnie wytworzenie związków o ogólnym wzorze X-Arg-Val-Ile-His-Pro-Y w jednoetapowej reakcji przez uwodornienie katalityczne.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku można oczyszczać znanymi metodami, korzystnie metodą chromatografii jonowymiennej na karboksymetylocelulozie. Stosując tę technologię wytwarzane związki otrzymuje się w postaci zliofilizowanego proszku i można je łatwo przeprowadzić w różne sole lub połączenia kompleksowe.

Aktywność antagonistyczną związków o ogólnym wzorze X-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Y testowano na samcach kota. Ciśnienie krwi mierzono na tętnicy szyjnej. Zwierzętom podawano „Hipertensin” (firmy Ciba) przez wstrzyknięcie do bocz-

nych związków. „Saralasin” użyto dla porównania. Wyniki podane w tablicy stanowią średnią wyników z 6 doświadczeń. Wielkość błędu określa rozrzut wartości podstawowej.

Z powyższej tablicy wynika, że każdy z analogów angiotensyny II zawierający w położeniu 1 resztę alifatycznego kwasu hydroksykarboksylowego wykazuje znaczne działanie obniżające ciśnienie krwi. Działanie to jest proporcjonalne do podanej dawki.

Testy te przeprowadzono również przy podaniu związków podskórnie. Należy zwrócić uwagę na

Tablica 1

Wpływ różnych analogów angiotensyny II, podawanych dożylnie, na ciśnienie krwi występujące po wstrzyknięciu dożylnym angiotensyny II

Związek badany	Spadek ciśnienia krwi w 10 ² Pa po podaniu dożylnym dawki	
	10 µg/kg	20 µg/kg
[Hydroksyacetylo ¹ , Leu ⁸]-Ang II	-41,3±6,25	-56,9±3,72
[Hydroksyacetylo ¹ , Ile ⁸]-Ang II	-32,0±2,26	-39,9±3,06
[Hydroksyacetylo ¹ , Thr/Me ⁸]-Ang II	-44,0±7,05	-50,5±5,45
[L-α-hydroksypropionylo ¹ , Leu ⁸]-Ang II	-42,7±4,92	-53,2±3,59
[L-α-hydroksypropionylo ¹ , Ile ⁸]-Ang II	-41,3±4,39	-50,5±5,45
„Saralasin”	-54,7±3,32	—

nej żyły udowej z szybkością 0,5 µg/kg/min. Po ustabilizowaniu się podwyższonego ciśnienia krwi podawano wodny, fizjologiczny lub zawierający nośnik roztwór testowanego związku „Saralasin”, w jednakowej dawce, dożylnie lub podskórnie, po czym mierzono spadek ciśnienia krwi.

W tablicy 1 przedstawiono otrzymane w testach spadki ciśnienia krwi po dożylnym podaniu ba-

35 fakt, że ta droga podawania angiotensyny II lub jej analogów nie została dotychczas opisana. Do podawania podskórnego użyto roztwór fizjologicznej solanki zawierającej badany związek oraz dodatek karboksymetylocelulozy lub żelatyny. Wyniki testu podane w tablicy 2 stanowią średnią wyników z 5 osobnych prób. Wielkość błędu określa rozrzut wartości podstawowej.

Tablica 2

Wpływ różnych analogów angiotensyny II, podawanych podskórnie, na ciśnienie krwi występujące po wstrzyknięciu dożylnie angiotensyny II

Związek badany	Dawka µg/kg	Rozpuszczalnik	Spadek ciśnienia krwi w 10 ² Pa po upływie			
			15 minut	30 minut	60 minut	120 minut
[L-α-hydroksypropionylo ¹ , Leu ⁸]-Ang II	200	roztwór CMC w fizjologicznym roztworze solanki	-37,2±4,13	-50,5±4,19	-33,2±1,90	-5,65±2,39
[L-α-hydroksypropionylo ¹ , Ile ⁸]-Ang II	200	żelatyna w fizjologicznym roztworze solanki	-37,2±13,3	-37,2±9,59	-33,2±7,98	-5,65±9,71

CMC = karboksymetyloceluloza

Z danych przedstawionych w tablicy 2 wynika, że nowe związki wytwarzane sposobem według wynalazku zmniejszają sztucznie wywołane wysokie ciśnienie krwi.

Określenie „połączenie kompleksowe” peptydów wytwarzanych w sposób według wynalazku odnosi się w tym opisie do połączeń kompleksowych z niektórymi substancjami organicznymi, które powodują opóźnione działanie peptydów. Typowe przykłady tego rodzaju substancji organicznych stanowią: żelatyna, karboksymetyloceluloza, estry kwasu alginowego, polifluoroetanofosforany, polimery aminokwasów lub inne polimery albo kopolimery.

Peptydy wytwarzane w sposób według wynalazku oraz ich dopuszczalne farmaceutycznie sole addycyjne i połączenia kompleksowe stosuje się w postaci typowych środków farmaceutycznych. Środki te zawierają związki wytwarzane w sposób według wynalazku z dodatkiem nieorganicznych nośników odpowiednich do podawania dojelitowo lub poza jelitowo. Mogą one być w postaci stałych liofilizatorów zawierających różne obojętne związki nie reagujące z peptydami, np. węglowodory użyte jako nośniki, albo w postaci rozcieńczonych lub stężonych zawiesin albo emulsji, które z kolei zawierają również środki konserwujące i środki stabilizujące.

Środki farmaceutyczne zawierające związki wytwarzane w sposób według wynalazku mogą być stosowane diagnostycznie od odróżnienia nadciśnienia nerkowego lub leczniczo przy syndromach wywołanych zwiększonym nerkowym ciśnieniem krwi.

Dalsze szczegóły sposobu według wynalazku ilustrują poniższe przykłady. Skróty stosowane w przykładach odpowiadają powszechnie stosowanym w literaturze biochemicznej (J. Biol. Chem. 247, 977/1972). Symbolem „O” przed symbolem α -aminokwasu oznaczono odpowiedni α -aminoksykwas, np. OGly oznacza kwas aminoksyoctowy, OAla oznacza kwas α -aminoksypropionowy itd. Dalsze skróty to na przykład PFP — pięciofluorofenyl i Z — karbometoksyl.

Prowadząc reakcję w sposób według wynalazku do odparowywania zawsze stosowano obrotową wyparkę próżniową firmy Büchi. Temperatury topnienia określano w aparacie dr. Tottoli (produkowanym przez Büchi). Chromatografię cienkowarstwową wykonywano na przykład z żelem krzemionkowym „Kieselgel G nach Stahl” firmy E. Merck. Chromatogramy rozwijano w następujących mieszaninach rozpuszczalników: 1) octan etylu: [mieszanina pirydyna/kwas octowy/woda 20:6:11] = 95:5; 2) ta sama 90:10; 3) ta sama 80:20; 4) ta sama 70:30; 5) mieszanina n-butanol/kwas octowy/woda 4:1:5; 6) mieszanina n-butanol/kwas octowy/pirydyna/woda 30:6:20:24; 7) mieszanina n-butanol/octan etylu/kwas octowy/woda 1:1:1:1. W podanych przykładach górny indeks przy wartości R_f oznacza numer użytego układu rozwijającego.

Elektroforezę bibulową przeprowadzono w poziomym aparacie średnionapięciowym LMIM na

bibule MN 214, w roztworze buforu pH 1,9, oprócz kwasu glutaminowego. Napięcie: 450 V, czas: 3 godziny.

Chromatogramy wywoływano częściowo roztworem ninhydryny, a częściowo typową metodą chlorowania przy użyciu roztworu o-toluidyna-KJ.

Produkt końcowy oczyszczano w następujący sposób: 0,5 g wolnego peptydu rozpuszczono w 4 ml 0,01 N buforu z octanu amonu i otrzymany roztwór naniesiono na kolumnę z karboksymetylocelulozą (CMC 52) o pojemności 0,5 litra. Kolumnę równoważono uprzednio tym samym buforem. Wymywanie prowadzono w gradiencie stężenia mieszając 1,5 litra 0,01 M i 1,5 litra 0,4 M roztworu octanu amonu w mieszalniku gradientu, przy szybkości wypływu 25 ml/h, zbierając frakcje po 10 ml. Wyciek z kolumny analizowano w świetle UV za pomocą spektrofotometru Uvicord II firmy LKB i określone na podstawie otrzymanej krzywej główne frakcje liofilizowane w liofilizatorze Leybold — Hereus, Liofilizat rechromatografowano stosując tę samą metodę gradientu stężeń i otrzymany eluat ponownie liofilizowano.

Przykład I. [Hydroksyacetylo¹, Leu⁶]-angiotensyna II

Etap 1. Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-(Dnp)-Pro-Leu-ONB. Do roztworu 4,2 g (12 mmoli) Leu-ONB. HBr w 50 ml chloroformu dodaje się 1,68 ml trójetylaminy i 3,81 (10 mmoli) Boc-Pro-OPFP. Całość miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu 20 minut, wytrząsa z wodą, a następnie z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego i suszy. Roztwór chloroformowy odparowuje się. Otrzymany chroniony dwupeptyd ($R_f^1 = 0,8$) rozpuszcza się w 20 ml 8 M roztworze kwasu solnego w dioksanie. Po 10 minutach, roztwór ten rozcieńcza się suchym eterem i odparowuje. Chlorowodorek dwupeptydu ($R_f^4 = 0,56$) rozpuszcza się w 50 ml chloroformu, doprowadza wartość pH roztworu do 8 za pomocą trójetylaminy i dodaje 8,8 g (15 mmoli) Boc-His(Dnp)-OPFP. Roztwór miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu jednej godziny utrzymując wartość pH równą 8. Następnie do roztworu dodaje się 1,65 ml N,N-dwumetylo-aminoetylaminy w celu usunięcia nadmiaru aktywnego estru i po 10 minutach mieszaninę tę wytrząsa się z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i 5% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego. Po osuszeniu roztwór odparowuje się.

Otrzymany chroniony trójepeptyd ($R_f^1 = 0,65$) rozpuszcza się w 25 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie i po 15 minutach wytrąca się trójepeptyd ($R_f^4 = 0,47$) przez dodanie suchego eteru. Osad odsąca się i zaraz rozpuszcza w mieszaninie 50 ml chloroformu i 20 ml dwumetyloformamidu. Wartość pH doprowadza się trójetylaminą do 8 i dodaje 6,0 g (15 mmoli) Boc-Ile-OPFP. Po upływie 30 minut mieszaninę reakcyjną odparowuje się do sucha, pozostałość rozpuszcza w 100 ml octanu etylu. Roztwór octanowy ek-

strahuje się wodnym roztworem kwasu cytrynowego, 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i na końcu z wodą. Po osuszeniu odparowuje się octan etylu, a pozostałość zadaje mieszaniną eteru i heksanu 1:9.

Uzyskany chroniony tetrapeptyd ($R_f^1 = 0,64$) wyodrębnia się i rozpuszcza w 25 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie. Po 15 minutach powstaje tetrapeptyd ($R_f^4 = 0,40$) wytrąca się suchym eterem i odsąca. Chlorowodorek tetrapeptydu rozpuszcza się w mieszaninie 50 ml chloroformu i 30 ml dwumetyloformamidu i doprowadza wartość pH roztworu do 8 za pomocą trójetyloaminy, po czym dodaje się 6,0 g (11,5 mola) Boc-Tyr(Bzl)-OPFP. Po 15 minutach roztwór odparowuje się, pozostałość rozpuszcza w octanie etylu i dodaje 0,66 ml N,N-dwumetylo-aminoetyloaminy. Całość pozostawia się na 10 minut, po czym wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą, suszy i odparowuje. Pozostałość po odparowaniu zadaje się suchym eterem i odsąca chroniony pentapeptyd ($R_f^2 = 0,8$). Produkt ten rozpuszcza się w 25 ml 8 N roztworu kwasu solnego w dioksanie i po 15 minutach wytrząsa się otrzymany pentapeptyd ($R_f^4 = 0,8$) dodając suchy eter. Osad odsąca się po czym przemywa eterem i zaraz rozpuszcza w 50 ml dwumetyloformamidu, doprowadza się trójetyloaminą wartość pH roztworu do 8 i dodając 4,2 g (11 mmoli) Boc-Val-OPFP. Całość miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu jednej godziny, po czym odparowuje, a otrzymaną pozostałość rozpuszcza się w chloroformie i wytrząsa kolejno z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Następnie roztwór osusza się i odparowuje, a pozostałość zadaje eterem.

Wytworzony chroniony heksapeptyd ($R_f^2 = 0,82$) odsąca się, rozpuszcza w 25 ml 8 N roztworu kwasu solnego w dioksanie i po 15 minutach wytrąca się suchym eterem heksapeptyd ($R_f^3 = 0,55$). Osad odsąca się i przemywa eterem i zaraz rozpuszcza w 50 ml dwumetyloformamidu, doprowadza się trójetyloaminą wartość pH roztworu do 8 i dodaje 4,8 g (10 mmoli) Boc-Arg(NO_2)-OPFP. Po upływie 30 minut rozpuszczalnik wymienia się na chloroform i roztwór chloroformowy wytrząsa się z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Z kolei roztwór osusza się, odparowuje i otrzymaną pozostałość traktuje etanolem. Wyodrębnia się chroniony heptapeptyd ($R_f^2 = 0,8$) uzyskując 7,6 g (53% w przeliczeniu na wyjściową Boc-Pro-OPFP). Temperatura topnienia 192–195°C.

Etap 2. Z-OGly-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Leu-ONB. 1,8 g (1,25 mmola) Boc-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Leu-ONB rozpuszcza się w 10 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie. Po 15 minutach chlorowodorek wodnego heptapeptydu wytrąca się suchym eterem, odsąca i przemywa suchym eterem. Otrzymany produkt ($R_f^3 = 0,36$) rozpuszcza się od razu

w 20 ml dwumetyloformamidu, doprowadza trójetyloaminą wartość pH do 8 i dodaje 0,9 g (2,3 mmola) Z-OGly-OPFP.

Po 15 minutach rozpuszczalnik wymienia się na chloroform, po czym roztwór chloroformowy wytrząsa się z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą, suszy i odparowuje. Pozostałość traktuje się mieszaniną etanolu i eteru (2:8), a następnie odsąca produkt otrzymując 1,6 g (85%) Z-OGly-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Leu-ONB, a temperatura topnienia 165–174°C ($R_f^2 = 0,80$).

Etap 3. Usuwanie grup ochronnych. 1,6 g (1,0 mmola) Z-OGly-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Leu-ONB rozpuszcza się w 5 ml dwumetyloformamidu i dodaje 3,5 ml 2-merkaptioetanolu. Roztwór miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu godziny, następnie dodaje suchy eter i odsąca wytrącony osad. Osad ten przemywa się dwoma porcjami po 10 ml eteru i oczyszcza przez wytrącanie z mieszaniny metanolu i eteru.

Otrzymuje się 1,3 g (95%) Z-OGly-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Leu-ONB, $R_f^2 = 0,2$.

Wyżej otrzymany peptyd rozpuszcza się w 30 ml mieszaniny metanolu, kwasu octowego i wody (5:1:1), dodaje 0,5 g 10% palladu na węglu i przepuszcza przez roztwór wodoru, przy silnym mieszanu, w ciągu 20 godzin. Przebieg reakcji kontroluje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji odsąca się katalizator, przemywa go 20 ml mieszaniny o takim samym składzie jak użyta do reakcji i przesącz odparowuje do sucha.

Pozostałość rozpuszcza się w mieszaninie etanolu i wody po czym odparowuje, powtarzając tę operację kilkakrotnie w celu usunięcia kwasu octowego. Następnie wyodrębnia się peptyd przez zadanie suchym etanolem i odsączenie. Otrzymuje się 0,8 g (67%) [hydroksyacetylo¹, Leu⁸]-angiotensyny II. Oczyszczenie prowadzi się jak wyżej opisano. $R_f^5 = 0,41$, $R_f^6 = 0,59$, $R_f^7 = 0,60$, E_{gm} (pH = 1,9) = 0,98. Analiza aminokwasów: Pro 1,0 (1), Val 1,01(1), Ile 1,02(1), Arg 1,01(1), His 1,0(1), Leu 1,02(1), Tyr 0,73(1).

Przykład II. [L- α -hydroksypropionylo¹, Leu⁸]-angiotensyna II

Etap 1. Z-OAla-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Leu-OMB. 1,8 g (1,25 mmola) Boc-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Leu-ONB otrzymanej w etapie 1 przykładu I rozpuszcza się w 8 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie. Wolny heptapeptyd wytrąca się z roztworu eterem, po czym odsąca i przemywa suchym eterem. Otrzymany związek ($R_f^3 = 0,36$) rozpuszcza się od razu w 20 ml dwumetyloformamidu, doprowadza trójetyloaminą wartość pH do 8 i dodaje 0,93 g (2,3 mmola) Z-OAla-OPFP. Po 15 minutach rozpuszczalnik wymienia się na chloroform i otrzymany roztwór wytrząsa z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą, a następnie osusza i odparowuje. Pozostałość traktuje się mieszaniną etanolu i eteru (4:1) otrzymując 1,75 g

(93%) Z-OAla-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Leu-ONB.

Etap 2. Usuwanie grup ochronnych 1,6 g Z-OAla-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Leu-ONB rozpuszcza się w 5 ml dwumetyloformamidu, dodaje 3,5 ml 2-merkaptetanolu i całość miesza w ciągu godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dodaje się suchego eteru i odsącza wytrącony osad, który dalej oczyszcza się przez wytrącanie z mieszaniny metanolu i eteru. Otrzymuje się 1,3 g (92%) Z-OAla-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Leu-ONB, $R_f^2 = 0,27$.

Peptyd ten rozpuszcza się w mieszaninie metanolu, kwasu octowego i wody (5:1:1), dodaje 0,5 g 10% palladu na węglu i przepuszcza przez roztwór wodoru, przy silnym zmieszaniu, w ciągu 20 godzin. Przebieg reakcji kontroluje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji katalizator odsącza się, przemywa i przesącza odparowuje do sucha. Pozostałość kilkakrotnie rozpuszcza się w mieszaninie etanolu z wodą i odparowuje, po czym suchą pozostałość traktuje się suchym etanolem, otrzymując [L- α -hydroksypropionyl⁴; Leu⁶]-angiotensynę II. Wydajność 0,65 g (70%). Produkt ten oczyszcza się jak wyżej opisano $R_f^5 = 0,36$, $R_f^6 = 0,57$, $R_f^7 = 0,60$, E_{cm} (pH = 1,9) = 0,97. Analiza aminokwasów: Pro 0,98(1), Val 1,0(1), Ile 1,1(1), Arg 1,0(1), His 0,98(1), Leu 0,98, Tyr 0,56(1).

Przykład III. [Hydroksyacetyl⁴; Ile⁶]-angiotensyna II

Etap 1. Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-ONB. Do roztworu 4,15 g (15 mmoli) Ile-ONB.HCl w 50 ml chloroformu dodaje się 2,1 ml trójetiloaminy, a następnie 3,81 g (10 mmoli) Boc-Pro-OPFP. Całość miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu 20 minut. Mieszaninę poreakcyjną wytrząsa się z wodą i z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, po czym osusza i odparowuje. Otrzymany chroniony dwupeptyd ($R_f^1 = 0,9$) rozpuszcza się w 20 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie, po 10 minutach rozcieńcza suchym eterem i odparowuje.

Chlorowodorek wolnego dwupeptydu ($R_f^4 = 0,44$) rozpuszcza się w 30 ml chloroformu, doprowadza trójetiloaminą wartość pH do 8 i dodaje 8,8 g (15 mmoli) Boc-His(Dnp)-OPFP. Po upływie godziny do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 1,65 ml N,N-dwumetylo-aminoetyloaminy, a po dalszych 15 minutach całość wytrząsa się z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Ekstrakt osusza się i odparowuje. Chroniony trójepeptyd ($R_f^1 = 0,50$) bez wyodrębniania rozpuszcza się w 20 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie. Po 15 minutach trójepeptyd ($R_f^4 = 0,25$) wytrąca się suchym eterem, odsącza i przemywa suchym eterem po czym zaraz rozpuszcza się w mieszaninie 50 ml chloroformu i 20 ml dwumetyloformamidu.

Wartość pH otrzymanego roztworu doprowadza się trójetiloaminą do 8 i dodaje 6,0 g (15 mmoli) Boc-Ile-OPFP. Całość pozostawia się na 30 mi-

nut, a następnie wymienia rozpuszczalnik na octan etylu i otrzymany roztwór wytrząsa się z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Ekstrakt osusza się, odparowuje i z pozostałości wyodrębnia chroniony tetrapeptyd przez ekstrakcję mieszaniną n-heksanu i eteru (9:1).

Chroniony tetrapeptyd ($R_f^2 = 0,65$) rozpuszcza się w 25 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie. Po upływie 30 minut otrzymany tetrapeptyd ($R_f^4 = 0,41$) wytrąca się dodając suchy eter, odsącza i przemywa, a następnie zaraz rozpuszcza w 70 ml mieszaniny dwumetyloformamidu i chloroformu (1:1). Wartość pH roztworu doprowadza się trójetiloaminą do 8 i dodaje 6,0 g (11,5 mmola) Boc-Tyr(Bzl)-OPFP. Po 15 minutach rozpuszczalnik wymienia się na octan etylu i dodaje 0,66 ml N,N-dwumetylo-aminoetyloaminy. Po upływie kolejnych 15 minut mieszaninę wytrząsa się z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą, następnie osusza i odparowuje. Otrzymany pentapeptyd ($R_f^2 = 0,59$) wydziela się dodając suchy eter. Z kolei rozpuszcza się go w 20 ml dioksynowego roztworu kwasu solnego i po 15 minutach wytrąca suchym eterem chlorowodorek pentapeptydu ($R_f^4 = 0,4$), odsącza i przemywa 20 ml suchego eteru, po czym zaraz rozpuszcza w 50 ml dwumetyloformamidu. Wartość pH roztworu doprowadza się trójetiloaminą do 8 i dodaje 4,62 g (12 mmoli) Boc-Val-OPFP.

Po upływie godziny rozpuszczalnik wymienia się na chloroform i otrzymany roztwór wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Ekstrakt osusza się, odparowuje i pozostałość traktuje suchym eterem w celu wytrącenia chronionego heksapeptydu ($R_f^2 = 0,50$). Peptyd ten rozpuszcza się następnie w 20 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie i po 15 minutach wytrąca suchym eterem heksapeptyd ($R_f^4 = 0,47$). Heksapeptyd odsącza się i przemywa 20 ml suchego eteru, po czym zaraz rozpuszcza się w 50 ml dwumetyloformamidu, wartość pH roztworu doprowadza trójetiloaminą do 8 i dodaje 5,38 g (12 mmoli) Boc-Arg(NO₂)-OPFP.

Mieszaninę pozostawia się na okres 30 minut, a następnie wymienia rozpuszczalnik na chloroform i otrzymany roztwór wytrząsa z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Ekstrakt osusza się, odparowuje i wyodrębnia chroniony heptapeptyd za pomocą etanolu. Otrzymuje się 9,7 g (68% w przeliczeniu na wyjściową Boc-Pro-OPFP) Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-ONB. $R_f^2 = 0,67$.

Etap 2. Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-ONB. Heptapeptyd rozpuszcza się w 8 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie. Roztwór pozostawia się na 15 minut, po czym wytrąca suchym eterem chlorowodorek heptapeptydu ($R_f^4 = 0,45$), odsącza i przemywa 20 ml suchego eteru. Osad rozpuszcza się zaraz w 10 ml dwu-

metyleformamidu, doprowadza trójetyloaminą wartość pH roztworu do 8 i dodaje 0,6 g (1,5 mmola) Z-OGly-OPFP.

Po upływie 30 minut rozpuszczalnik wymienia się na chloroform i roztwór ten wytrząsa z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Ekstrakt osusza się, odparowuje po czym wyodrębnia chroniony peptyd suchym eterem. Otrzymuje się 1,45 g (85%) Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-ONB. Temperatura topnienia 151–158°C, $R_f^2 = 0,68$.

Etap 3. Usuwanie grup ochronnych, 1,45 g (0,94 mmola) Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-ONB rozpuszcza się w 5 ml dwumetyloformamidu, dodaje 3,5 ml 2-merkaptotetanolu, całość miesza w ciągu jednej godziny, po czym suchym eterem wytrąca się Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Ile-ONB. Po strącaniu w układzie metanol-eter otrzymuje się 1,05 g (82%) peptydu ($R_f^2 = 0,10$). Peptyd ten rozpuszcza się w 30 ml mieszaniny metanolu, kwasu octowego i wody (5:1:1), dodaje 0,5 g 10% palladu na węglu i przepuszcza wodór przez roztwór w ciągu 21 godzin przy silnym mieszaniu.

Przebieg reakcji kontroluje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji katalizator odsąca się, przesącz odparowuje do sucha i wyodrębnia wolny peptyd suchym etanolem. Otrzymuje się 0,48 g (64,52) [hydroksyacetylo¹, Ile⁸] angiotensyny II. Produkt oczyszcza się znanymi metodami. $R_f^5 = 0,29$, $R_f^6 = 0,57$, $R_f^7 = 0,58$, $E_{GM}(pH = 1,9) = 1,03$. Analiza aminokwasów: Pro 0,99(1), Val 1,15(1), Ile 2,06(2), Tyr 0,74(1), His 0,98(1), Arg 0,95.

Przykład IV. [L- α -hydroksypropionylo¹, Ile⁸]-angiotensyna II

Etap 1. Z-OAla-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-ONB. 1,6 g (1,1 mmola) Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-ONB rozpuszcza się w 8 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie. Roztwór pozostawia się na 15 minut, po czym suchym eterem wytrąca się heptapeptyd ($R_f^4 = 0,45$), odsąca i przemywa, a następnie od razu rozpuszcza w 10 ml dwumetyloformamidu. Wartość pH roztworu doprowadza się trójetyloaminą do 8 i dodaje 0,61 g (1,5 mmola) Z-OAla-OPFP. Po upływie 30 minut rozpuszczalnik wymienia się na chloroform i roztwór chloroformowy wytrząsa z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Po osuszeniu i odparowaniu uzyskany chroniony peptyd ($R_f^2 = 0,63$) wyodrębnia się eterem. Otrzymuje się 1,4 g (83%) Z-OAla-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-ONB. Temperatura topnienia 164–168°C.

Etap 2. Usuwanie grup ochronnych, 1,4 g (0,9 mmola) Z-OAla-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-ONB rozpuszcza się w 5 ml dwumetyloformamidu i dodaje 3,5 ml 2-merkaptotetanolu. Roztwór pozostawia się na jedną godzinę, po czym wytrąca eterem Z-OAla-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Ile-ONB i oczyszcza przez wytrącanie w układzie metanol-eter. Wydajność 0,8 g (65%), $R_f^2 = 0,13$, $R_f^8 = 0,27$. Tak otrzymany chroniony

peptyd rozpuszcza się w 10 ml mieszaniny metanolu, kwasu octowego: wody (5:1:1), do roztworu dodaje 0,5 g 10% palladu na węglu po czym przy mieszaniu przepuszcza się przez roztwór wodór w ciągu 16 godzin. Po zakończeniu reakcji katalizator odsąca się, przesącz zateża i wyodrębnia produkt suchym etanolem. Otrzymuje się 0,4 g (65%) [L- α -hydroksypropionylo¹, Ile⁸]-angiotensyny II. Oczyszczanie przeprowadza się wyżej opisaną metodą. $R_f^5 = 0,30$, $R_f^6 = 0,30$, $R_f^7 = 0,58$, $R_f^8 = 0,58$, $E_{GM}(pH = 1,9) = 1,07$. Analiza aminokwasów: Pro 1,04(1), Val 0,98(1), Ile 1,98(2), Tyr 0,98(1), His 1,05(1), Arg 1,0(1).

Przykład V. [Hydroksyacetylo¹, Ala⁸]-angiotensyna II

Etap 1. Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ala-ONB. Do roztworu 1,21 g (4 mmole) Ala-ONB. HBr w 15 ml chloroformu dodaje się 0,56 ml trójetyloaminy i 0,76 g (2 mmole) Boc-Pro-OPFP. Roztwór miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu 20 minut, ekstrahuje wodą i 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, osusza i odparowuje. Otrzymany chroniony, dwupeptyd ($R_f^1 = 0,64$) bez wyodrębniania rozpuszcza się w 4 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie. Roztwór pozostawia się na 10 minut, po czym rozcieńcza eterem i odparowuje.

Chlorowodorek dwupeptydu ($R_f^4 = 0,65$) rozpuszcza się w 15 ml chloroformu, wartość pH roztworu doprowadza trójetyloaminą do 8 i dodaje 1,76 g (3 mmole) Boc-His(Dnp)-OPFP. Po upływie 30 minut do roztworu dodaje się 0,44 ml N,N-dwumetyloaminoetyloaminy, pozostawia na 5 minut, po czym wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z 5% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego. Ekstrakt osusza się, odparowuje i uzyskany chroniony trójpeptyd ($R_f^2 = 0,57$) rozpuszcza się w 4 ml 8 M roztworem kwasu solnego w dioksanie. Następnie po 10 minutach trójpeptyd ($R_f^8 = 0,28$) wytrąca się suchym eterem, odsąca i przemywa eterem, po czym od razu rozpuszcza w 20 ml mieszaniny chloroformu i dwumetyloformamidu (1:1).

Wartość pH roztworu doprowadza się trójetyloaminą do 8 i dodaje 1,58 g (4 mmole) Boc-Ile-OPFP. Po upływie 20 minut rozpuszczalnik wymienia się na octan etylu i roztwór octanowy wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, a następnie z wodą. Po osuszeniu, odparowaniu roztworu chroniony tetrapeptyd ($R_f^2 = 0,57$) łączy się z mieszaniną eteru i n-heksanu (1:9), a następnie odsąca. Z kolei rozpuszcza się go w 4 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie, pozostawia na 15 minut, wytrąca tetrapeptyd ($R_f^3 = 0,38$) suchym eterem, odsąca, przemywa i od razu rozpuszcza w 15 ml mieszaniny chloroformu i dwumetyloformamidu (2:1). Wartość pH roztworu doprowadza się trójetyloaminą do 8 i dodaje 1,66 g (3 mmole) Boc-Tyr(Bzl)-OPFP. Po 15 minutach rozpuszczalnik wymienia się na octan etylu i dodaje 0,22 ml N,N-dwumetyloamino-

etyloaminy. Po dalszych 5 minutach mieszaniny wytrząsa się z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Po osuszeniu i odparowaniu uzyskany chroniony pentapeptyd ($R_f^2 = 0,60$) przenosi się do eteru, odsąca i przemywa eterem. Następnie rozpuszcza się go w 4 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie i po 10 minutach wytrąca eterem pentapeptyd ($R_f^4 = 0,62$), odsąca, przemywa suchym eterem i od razu rozpuszcza w 20 ml mieszaniny chloroformu i dwumetyloformamidu (1:1). Wartość pH roztworu doprowadza się trójetyloaminą do 8 i dodaje 1,6 g (4 mmole) Boc-Val-OPFP. Mieszaninę pozostawia się na 20 minut, po czym rozpuszczalnik wymienia na octan etylu i roztwór octanowy wytrząsa z wodą i z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego. Ekstrakt osusza się, odparowuje i uzyskany chroniony heksapeptyd ($R_f^2 = 0,65$) przenosi do eteru, sączy, przemywa eterem i od razu rozpuszcza w 20 ml dwumetyloformamidu.

Wartość pH roztworu doprowadza się trójetyloaminą do 8 i dodaje 2,9 g (6 mmoli) Boc-Arg(NO₂)-OPFP. Po upływie 20 minut rozpuszczalnik wymienia się na chloroform i roztwór chloroformowy wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego i z wodą, osusza i odparowuje. Pozostałość uciera się z mieszaniną octanu etylu i eteru (1:2), sączy i przemywa tą samą mieszaniną rozpuszczalników. Otrzymuje się 2,0 g (72%) odpowiedniego chronionego heptapeptydu. Temperatura topnienia 185–187°C, $R_f^2 = 0,70$.

Etap 2. Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ala-ONB. 1,35 g (1 mmol) Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ala-ONB rozpuszcza się w 4 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie i pozostawia na 15 minut. Następnie suchym eterem wytrąca się chlorowodorek heptapeptydu ($R_f^4 = 0,63$), odsąca, przemywa eterem i od razu rozpuszcza w 15 ml dwumetyloformamidu.

Wartość pH roztworu doprowadza się trójetyloaminą do 8 i dodaje 0,96 g (2,5 mmola) Z-OGly-OPFP. Po 20 minutach rozpuszczalnik wymienia się na chloroform i roztwór chloroformowy wytrząsa z wodą. Ekstrakt osusza się, odparowuje i wyodrębnia chroniony peptyd etanolem. Wydajność 1,16 g (83%). Temperatura topnienia 133–135°C, $R_f^2 = 0,72$.

Etap 3. Usuwanie grup ochronnych. 1,5 g (1 mmol) Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ala-ONB rozpuszcza się w 5 ml dwumetyloformamidu i dodaje 2,95 ml 2-merkaptotetanolu. Roztwór pozostawia się na jedną godzinę, po czym dodaje suchy eter, odsąca wytrącony osad i przemywa go etanolem. Otrzymuje się 1,1 g (82%) Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Ala-ONB. $R_f^2 = 0,15$, $R_f^3 = 0,40$. Tak otrzymany chroniony peptyd rozpuszcza się w mieszaninie metanolu, kwasu octowego i wody (5:1:1), dodaje 0,5 g 10% palladu na węglu, po czym przy silnym mieszanii przepuszcza się przez tę mieszaninę wodór w ciągu 24 godzin.

Przebieg reakcji kontroluje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji katalizator odsąca się, przemywa 15 ml mieszaniny o takim samym składzie jak użyta do reakcji, następnie przesącza i odparowuje się do sucha, uzyskaną pozostałość przenosi się do mieszaniny etanol/woda i odparowuje kilkakrotnie.

Produkt wyodrębnia się suchym etanolem. Otrzymuje się 0,55 g (80%) [hydroksyacetylo¹, Ala⁸]-angiotensyny II, którą oczyszcza się następnie jak wyżej opisano $R_f^5 = 0,28$, $R_f^6 = 0,48$, $R_f^7 = 0,50$, E_{Gm} (pH = 1,9) = 1,0. Analiza aminokwasów: Pro 0,95(1), Ala 1,1(1), Val 1,0(1), Ile 1,0(1), His 1,0(1), Arg 1,0(1), Tyr 0,9(1).

Przykład VI. [Hydroksyacetylo¹, Thr(Me)⁹]-angiotensyna II

Etap 1. Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe. 0,69 g (3 mmole) Thr(Me)-OMe.HBr rozpuszcza się w 30 ml chloroformu i dodaje 0,42 ml trójetyloaminy oraz 1,7 g (4,5 mmola) Boc-Pro-OPFP. Roztwór pozostawia się na okres dwóch godzin, po czym dodaje 0,33 ml N,N-dwumetyloaminoetyloaminy. Po 15 minutach rozpuszczalnik wymienia się na octan etylu i roztwór octanowy wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego, z wodą i z 5% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego. Po osuszeniu i odparowaniu uzyskany chroniony dwupeptyd ($R_f^1 = 0,76$) rozpuszcza się bez wyodrębniania w 2 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie. Po 15 minutach roztwór rozcieńcza się eterem i odparowuje.

Powstały dwupeptyd ($R_f^3 = 0,18$) rozpuszcza się w 20 ml chloroformu, wartość pH roztworu doprowadza trójetyloaminą do 8 i dodaje 2,6 g (4,5 mmoli) Boc-His(Dnp)-OPFP. Całość miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu dwóch godzin, a następnie dodaje 0,22 ml N,N-dwumetyloaminoetyloaminy i po 15 minutach wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Po osuszeniu i odparowaniu uzyskany trójpeptyd ($R_f^1 = 0,5$) rozpuszcza się bez wyodrębniania w 4 ml 8 N wodnego roztworu kwasu solnego i po upływie 15 minut trójpeptyd ($R_f^3 = 0,3$) wytrąca się suchym eterem, osad odsąca się, przemywa eterem i od razu rozpuszcza w 20 ml mieszaniny chloroformu i dwumetyloformamidu (1:1). Wartość pH roztworu doprowadza się trójetyloaminą do 8 i dodaje 1,6 g (4 mmole) Boc-Ile-OPFP. Po 30 minutach rozpuszczalnik wymienia się na octan etylu i roztwór octanowy wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą, osusza i odparowuje. Pozostałość traktuje się mieszaniną eteru i n-heksanu 1:9 i wyodrębnia chroniony tetrapeptyd. Następnie rozpuszcza się go w 7 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie, roztwór pozostawia na 15 minut, po czym strąca suchym eterem tetrapeptyd ($R_f^4 = 0,27$) i od razu rozpuszcza w 20 ml mieszaniny chloroformu i dwumetyloformamidu (1:1).

Wartość pH roztworu doprowadza się trójetyloaminą do 8 i dodaje 1,6 g (3 mmole) Boc-Tyr(Bzl)-OPFP. Po upływie 30 minut rozpuszczalnik wymienia się na octan etylu i dodaje 0,22 ml N,N-dwumetyloaminoetyloaminy. Roztwór pozostawia się na 15 minut, a następnie wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Ekstrakt osusza się, odparowuje i eterem wyodrębnia chroniony pentapeptyd ($R_f^2 = 0,63$). Otrzymuje się 0,4 g chronionego pentapeptydu. Związek ten rozpuszcza się w 1 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie i po 15 minutach wytrąca suchym eterem pentapeptyd ($R_f^4 = 0,47$), odsącza go i przemywa eterem, po czym zaraz rozpuszcza w 10 ml dwumetyloformamidu. Wartość pH roztworu doprowadza się trójetyloaminą do 8 i dodaje 0,4 g (1 mmol) Boc-Val-OPFP.

Po upływie godziny rozpuszczalnik wymienia się na chloroform i otrzymany roztwór wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą, po czym osusza, odparowuje i eterem wyodrębnia chroniony heksapeptyd ($R_f^2 = 0,65$). Produkt ten rozpuszcza się w 1,5 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie, roztwór pozostawia na 15 minut, a następnie wytrąca suchym eterem heksapeptyd ($R_f^4 = 0,48$). Osad odsącza się, przemywa eterem i od razu rozpuszcza w 10 ml dwumetyloformamidu. Wartość pH roztworu doprowadza się trójetyloaminą do 8 i dodaje 0,45 g (1 mmol) Boc-Arg(NO₂)-OPFP. Po upływie godziny rozpuszczalnik wymienia się na octan etylu i roztwór octanowy wytrząsa z 10% wodnym roztworem kwasu cytrynowego, z 1 N wodnym roztworem kwasu solnego i z wodą. Ekstrakt osusza się, odparowuje i pozostałość traktuje mieszaniną eteru z etanolem (9:1) otrzymując 0,45 g (11,3%) chronionego heptapeptydu. $R_f^2 = 0,38$, temperatura topnienia 199–203°C (rozkład).

Etap 2. Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe. 0,45 g (0,34 mmola) Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe rozpuszcza się w 2 ml 8 M roztworu kwasu solnego w dioksanie. Roztwór pozostawia się na 15 minut po czym wytrąca się heptapeptyd ($R_f^4 = 0,35$) suchym eterem. Osad zaraz rozpuszcza się w 10 ml dwumetyloformamidu, wartość pH roztworu doprowadza trójetyloaminą do 8 i dodaje 0,4 g (1 mmol) Z-OGly-OPFP.

Po upływie godziny mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się 30 ml chloroformu, a następnie wytrząsa z wodą. Po osuszeniu i odparowaniu ekstraktu chroniony peptyd wyodrębnia się mieszaniną eteru i etanolu (9:1).

Wydajność 0,45 g (93%), temperatura topnienia 158–162°C, $R_f^2 = 0,44$.

Etap 3. Usuwanie grup ochronnych. 0,45 g (0,31 mmola) Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe rozpuszcza się w 1,5 ml dwumetyloformamidu i dodaje 1 ml 2-merkaptetanolu. Po upływie godziny peptyd wytrąca się

suchym eterem, rozpuszcza w metanolu, odbarwia małą ilością węgla i na koniec, odparowuje. Pozostałość traktuje się eterem i sączy. Otrzymuje się 0,38 g (98%) Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Thr(Me)-OMe. $R_f^3 = 0,16$, $R_f^4 = 0,52$. Produkt ten przeprowadza się w zawiesinę w 5 ml dioksanu i dodaje 1,2 ml 1 N wolnego roztworu wodorotlenku sodowego. Roztwór pozostawia się na jedną godzinę, po czym doprowadza wartość pH do 3 za pomocą 1 N wodnego roztworu kwasu solnego.

Otrzymany osad rozpuszcza się w mieszaninie chloroformu i dwumetyloformamidu. Po osuszeniu i odparowaniu otrzymany peptyd wolny na C-końcu traktuje się eterem. Otrzymuje się 0,26 g (70%) wolnego peptydu o $R_f^4 = 0,25$. Peptyd ten rozpuszcza się w 10 ml mieszaniny metanolu, kwasu octowego i wody (5:1:1) i dodaje 0,1 g palladu na węglu, po czym przez roztwór przepuszcza się przy mieszaniu wodór w ciągu 16 godzin. Przebieg reakcji kontroluje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji katalizator odsącza się, a przesącz odparowuje do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w mieszaninie wody z etanolem i odparowuje kilkakrotnie. Otrzymuje się 0,16 g (80%) [hydroksyacetylo¹, Thr(Me)²]-angiotensyny II, którą oczyszcza jak wyżej opisano. $R_f^5 = 0,22$, $R_f^6 = 0,53$, $R_f^7 = 0,50$, $E_{GM}(pH = 1,9) = 0,98$.

Analiza aminokwasów: Thr 0,6(1), Pro 1,0(1), Val 1,0(1), Ile 1,02(1), Tyr 0,85(1), His 1,0(1), Arg 0,96(1).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych peptydów o ogólnym wzorze X-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Y, w którym X oznacza rodnik pochodzący z alifatycznego kwasu α -hydroksykarboksylowego, a Y oznacza rodnik pochodzący z alifatycznego kwasu α -aminokarboksylowego, oraz ich soli addycyjnych z kwasami i połączeń kompleksowych, **znamienny tym**, że reaktywną pochodną heptapeptydu o ogólnym wzorze H-Arg-(A)-Val-Tyr(B)-Ile-His(E)-Pro-Y-OG, w którym A oznacza grupę odpowiednią do okresowej ochrony grupy guanidynowej arginy, B oznacza grupę odpowiednią do okresowej ochrony aromatycznej grupy hydroksylowej tyroiny, E oznacza grupę odpowiednią do okresowej ochrony grupy imidazolowej histydyny, G oznacza grupę odpowiednią do ochrony grupy karboksylowej końcowego węgla aminokwasu, trwałą w łagodnie kwasowych warunkach, ale odszczepialną przez silne kwasy lub zasady albo na drodze uwodornienia katalitycznego, a Y ma wyżej określone znaczenie, poddaje się reakcji z reaktywną pochodną kwasu aminoksykarboksylowego o ogólnym wzorze W-X'-M, w którym X' oznacza grupę α -aminoksyacylową pochodzącą z alifatycznego kwasu karboksylowego, W oznacza grupę ochronną odszczepialną przez hydrolizę kwaśną lub katalityczne uwodornienie, a M oznacza grupę hydroksylową lub grupę aktywującą, odszczepia się

grupę ochronną E z otrzymanego związku o ogólnym wzorze $W-X'-Arg(A)-Val-Tyr(B)-Ile-His(E)-Pro-Y-OG$, w którym B, W, X', Y, A, E i G mają wyżej określone znaczenia, a następnie odszczepia się pozostałe grupy ochronne łańcucha bocznego i grup końcowych, przy czym te pozostałe grupy usuwa się przez uwodornienie katalityczne, i ewentualnie przekształca tak otrzymany związek o ogólnym wzorze $X-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Y$ w sól addycyjną z kwasem lub połączenie kompleksowe.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako związek wyjściowy stosuje się związek o ogólnym wzorze $H-Arg(A)-Val-Tyr(B)-Ile-His(E)-Pro-Y-OG$, w którym A oznacza grupę nitrową lub tosyłową, B oznacza ewentualnie podstawioną grupę benzylową, a E oznacza grupę dwunitro-

fenylową, oraz związek wyjściowy o ogólnym wzorze $W-X'-M$, w którym W oznacza grupę benzyloksykarbonyłową lub III rz.-butoksykarbonyłową, X' oznacza grupę aminoksyacetylową lub α -aminoksypropionylową, a M oznacza grupę piwaloiloksyłową, nitrofenoksyłową, 2,3,5-trójklorofenoksyłową, pięcioklorofenoksyłową, pięciofluorofenoksyłową, N-sukcynimidoksyłową lub azydową.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że grupę ochronną E usuwa się za pomocą 2-merkaptoetanolu.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako związek wyjściowy stosuje się związek o ogólnym wzorze $H-Arg(A)-Val-Tyr(B)-Ile-His(E)-Pro-Y-OG$, w którym Y oznacza korzystnie grupę leucylową, izoleucylową, alanylową lub treonylową.