



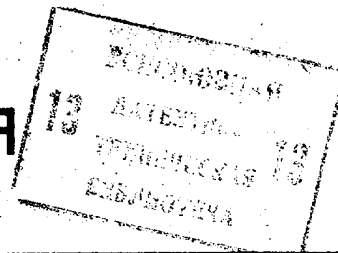
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1041030** **A**

3(5) С 07 С 103/52 // А 61 К 37/02

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ



- (21) 3226301/23-04
(22) 16.01.81
(31) 101/80
(32) 18.01.80
(33) ВНР
(46) 07.09.83. Бюл. № 33
(72) Ольга Ньюки, Лайош Кишфалуди,
Эгон Карпати и Ласло Спорни (ВНР)
(71) Рихтер Геден Ведевети Дьяр,
РТ (ВНР)
(53) 547.964.4.07(088.8)
(56) 1. Патент СССР № 845773,
кл. С 07 С 103/52, опублик. 1981.
2. Гринштейн Дж., Виноц М. Хи-
мия аминокислот и пептидов. М.,
1965, с. 692.
(54)(57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МЕТИЛОВЫХ
ЭФИРОВ ОКТАПЕПТИДОВ общей формулы I
X-Arg-Va β -Tyr-I β e-His-Fro-Y-OMe,

где X-Sar, оксиацетил;
Y-I β e, Thr(Me), Thr, Ala,
отличающийся тем, что
от защищенного метилового эфира ок-
тапептида общей формулы II

Z-Arg(NO₂)-Va β -Tyr(Bz β)-I β e-
His(Dnp)-Y-OMe,

где Z - бензилоксикарбонил;
NO₂ - нитрогруппа;
Bz β - бензил;
Dnp - динитрофенил;
X, Y имеют указанные значения,
отщепляют динитрофенильную защит-
ную группу путем обработки 2-мер-
каптоэтанолом, а затем удаляют ос-
тальные защитные группы путем ката-
литического гидрогенолиза.

(19) **SU** (11) **1041030** **A**

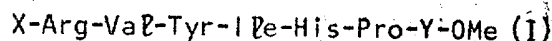
Изобретение относится к способу получения новых соединений, а именно метиловых эфиров октапептидов, и может быть использовано в медицине.

Известен способ получения пептидов путем отщепления динитрофенильной защитной группы от соответствующего защищенного пептида в среде диметилформамида под действием 2-меркаптоэтанола в течение 1,5-2,0 ч при комнатной температуре [1].

Известен также способ удаления защитных групп в пептидах путем каталитического гидрогенолиза в водно-органической среде в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле [2].

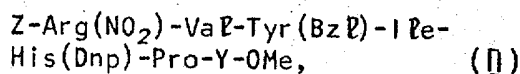
Цель изобретения - получение новых пептидов, обладающих ценными фармакологическими свойствами.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу получения метиловых эфиров октапептидов общей формулы



где X - Sar, оксиацетил;

Y - Iβe, Thr(Me), Thr, Aβa, от метилового эфира защищенного октапептида общей формулы



где Z - бензилоксикарбонил;

NO₂ - нитрогруппа;

Bzβ - бензил;

Dnp - динитрофенил;

X и Y имеют указанные значения, отщепляют динитрофенильную защитную группу обработкой 2-меркаптоэтанола, а затем удаляют остальные защитные группы путем каталитического гидрогенолиза.

Используемые в качестве исходных веществ метиловые эфиры октапептидов общей формулы (II) получают известными методами пептидной химии путем ступенчатого наращивания пептидной цепи с использованием пентафторфениловых эфиров защищенных аминокислот [1].

Для защиты боковых функциональных групп применяют защитные группы, стабильные в условиях ацидолиза, проводимого для отщепления защитных групп после завершения реакции образования пептидной связи. Для временной защиты гидроксильной груп-

пы тирозина используют бензильную группу (Bzβ), для защиты имидазольного цикла гистидина - динитрофенильную группу (Dnp) и для защиты гуанидиногруппы аргинина - нитрогруппу (NO₂). Эти защитные группы устойчивы к действию кислот, вследствие чего трет-бутилоксикарбонильная группа (Boc), используемая для защиты α-аминогрупп в процессе наращивания пептидной цепи, отщепляется селективно без затрагивания названных защитных групп.

Получение новых метиловых эфиров октапептидов общей формулы (I) иллюстрируется приведенными примерами, где сокращение HOAA - оксуксусная кислота.

Тонкослойную хроматографию проводят на пластинках с использованием следующих систем растворителей:

1. Этилацетат: (пиридин - уксусная кислота - вода 20:6:11)=98:2.

2. Этилацетат: (пиридин - уксусная кислота - вода 20:6:11)=95:5.

3. Этилацетат: (пиридин - уксусная кислота - вода 20:6:11)=90:10.

4. Этилацетат: (пиридин - уксусная кислота - вода 20:6:11)=80:20.

5. Этилацетат: (пиридин - уксусная кислота - вода 20:6:11)=70:30.

6. Этилацетат: (пиридин - уксусная кислота - вода 20:6:11)=60:40.

7. н-Бутанол:уксусная кислота:вода=4:1:5.

8. н-Бутанол:уксусная кислота:пиридин:вода=30:6:20:24.

9. н-Бутанол:этилацетат:уксусная кислота:вода=1:1:1:1.

10. н-Бутаэтилацетат: (пиридин - уксусная кислота - вода 20:6:11)=75:25.

Тонкослойные хроматограммы проявляют нингидрином или раствором хлортолидин с йодистым калием.

Очистку целевых продуктов проводят общепринятым методом: 0,5 г пептида в 4 мл 0,01 М раствора ацетата аммония пропускают через колонку, содержащую 0,5 л карбоксиметилцеллюлозы (СМС-52) и предварительно уравновешенную 0,01 М раствором ацетата аммония. Продукт очищают градиентным элюированием с использованием 1,5 л 0,01 М раствора ацетата аммония и 1,5 л 0,4 М раствора ацетата аммония. Скорость элюирования 25 мл/ч. Собирают фракции по 10 мл и детектируют с помощью прибора "LKB Uvi-

cord 11". Очищенный целевой продукт получают лиофилизацией основной фракции.

П р и м е р 1. Метиловый эфир (Sar¹, I¹Le⁸)-ангиотензина 11.

Стадия 1. Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bz-L-I¹Le-His(Dnp)-Pro-I¹Le-OMe.

К 1,36 г (7,5 ммоль) хлоргидрата метилового эфира изолейцина в 30 мл хлороформа добавляют 1,05 мл триэтиламина и 1,90 г (5 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-пролина. Смесь перемешивают 30 мин при постоянном pH и экстрагируют водой, 10%-ным водным раствором лимонной кислоты и водой. Органический слой сушат над сульфатом натрия и упаривают. Полученный в остатке защищенный дипептид ($R_f^{(1)}=0,8$) растворяют в 5 мл 8 н. соляной кислоты в диоксане. Через 15 мин раствор разбавляют 20 мл безводного эфира и упаривают. Полученный в остатке хлоргидрат дипептида ($R_f^{(5)}=0,46$) растворяют в 30 мл хлороформа, добавляют триэтиламин до pH 8 и 4,36 г (7,5 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-гистидина. Через 1 ч к раствору добавляют 0,83 мл N,N-диметиламиноэтиламина и через 15 мин экстрагируют 10%-ным водным раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором хлористого натрия, 1 н. раствором соляной кислоты, 5%-ным водным раствором бикарбоната натрия и водой. Органическую фазу сушат над сульфатом натрия и упаривают. Полученный в остатке защищенный трипептид ($R_f^{(2)}=0,45$) без очистки растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане. Через 15 мин раствор разбавляют безводным эфиром, выпавший в осадок хлоргидрат свободного трипептида отфильтровывают, промывают эфиром и растворяют в 15 мл диметилформамида. К полученному раствору добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,4 г (6 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-изолейцина. Смесь выдерживают 30 мин при постоянном pH и упаривают. Остаток растворяют в этилацетате. Раствор промывают 10%-ным водным раствором лимонной кислоты, 1 н. раствором соляной кислоты, водой, сушат над сульфатом натрия и упаривают. Остаток растирают со смесью эфир - гексан (1:9) и отфильтровывают. Полученный защищенный тетрапептид ($R_f^{(2)}=0,31$) ра-

створяют в 7 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане. Через 15 мин добавляют безводный эфир и выпавший при этом в осадок хлоргидрат свободного тетрапептида отфильтровывают. Полученный тетрапептид ($R_f^{(5)}=0,38$) растворяют в смеси, состоящей из 10 мл диметилформамида и 20 мл хлороформа, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,96 г (5,5 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-0-бензил-тирозина. Смесь выдерживают при постоянном pH 15 мин и упаривают. Остаток растворяют в этилацетате, добавляют 0,22 мл N,N-диметиламиноэтиламина и через 10 мин промывают 10%-ным водным раствором лимонной кислоты, 1 н. раствором соляной кислоты и водой. Органическую фазу сушат над сульфатом натрия и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный пентапептид ($R_f^{(2)}=0,52$) растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане, через 15 мин добавляют безводный эфир и выпавший осадок отфильтровывают и промывают эфиром. Полученный хлоргидрат свободного пентапептида ($R_f^{(5)}=0,8$) растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,3 г (6 ммоль) БОК-пентафторфенилового эфира БОК-валина. Смесь выдерживают при постоянном pH 1 ч и упаривают. Остаток растворяют в хлороформе и полученный раствор промывают 10%-ным водным раствором лимонной кислоты, 1 н. раствором соляной кислоты, водой, сушат над сульфатом натрия и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный гексапептид ($R_f^{(2)}=0,43$) растворяют в 8 н. растворе соляной кислоты в диоксане, через 15 мин добавляют безводный эфир и выпавший осадок отфильтровывают и промывают эфиром. Полученный хлоргидрат свободного гексапептида растворяют в 15 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,6 г (6 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-NG-нитроаргина. Смесь выдерживают при постоянном pH 30 мин, добавляют 45 мл хлороформа, промывают 1 н. раствором соляной кислоты и водой, сушат над сульфатом натрия и упаривают. Остаток растирают с этилацетатом и отфильтровывают.

Получают 3,3 г Boc-Arg-(NO₂)-Val-Tyr-(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-OMe (выход 51% от теоретического в расчете на исходное соединение - пентафторфениловый эфир БОК-пролина). $R_f^{(3)}=0,37$.

Стадия 2. Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-OMe.

3,3 г (2,5 ммоль) метилового эфира Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile растворяют в 15 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане, через 20 мин добавляют безводный эфир, выпавший продукт отфильтровывают и промывают эфиром. Полученный хлоргидрат свободного гептапептида ($R_f^{(5)}=0,7$) растворяют в 15 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,4 г (6 ммоль) пентафторфенилового эфира Z-Sar. Смесь выдерживают при постоянном pH 30 мин, добавляют 45 мл хлороформа, промывают 1 н. раствором соляной кислоты и водой, сушат над сульфатом натрия и упаривают. Остаток растирают с этанолом и отфильтровывают.

Получают 3,17 г (89% от теоретического) защищенного октапептида Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-OMe. Т.пл. 197-209°C. $R_f^{(4)}=0,82$.

Стадия 3. Удаление защитных групп.

2,59 г (1,83 ммоль) Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-OMe растворяют в 5 мл диметилформамида и к раствору добавляют 4,6 мл 2-меркаптоэтанола. Смесь перемешивают 1 ч и добавляют безводный эфир. Выпавший осадок отфильтровывают. Получают 2,0 г (87% от теоретического) Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Ile-OMe ($R_f^{(4)}=0,42$). Продукт растворяют в 40 мл смеси метанол - уксусная кислота - вода 5:1:1, добавляют 1,0 г 10%-ного палладия на активированном угле и через раствор в течение 20 ч при интенсивном перемешивании пропускают водород. Затем катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Остаток смешивают с водным этанолом и упаривают. Операцию повторяют несколько раз. Затем остаток растирают с безводным эфиром, отфильтровывают и сушат.

Получают 1,56 г (98% от теоретического) метилового эфира (Sar¹, Ile⁸)-ангиотензина 11. Продукт очищают как описано выше.

5 Конечный продукт имеет следующие характеристики: $R_f^{(4)}=0,19$; $R_f^{(6)}=0,59$; $R_f^{(5)}=0,38$; $E_{\text{ген}}(\text{pH}=1,9):1,00$.

Аминокислотный анализ: Pro 1,07(1) Val 1,9 (1); Tyr 0,8 (1); His 1,03(1) Arg 1,0 (1); Ile 1,87 (2); Sar 1,0(1)

10 П р и м е р 2. Метилловый эфир (OGly¹, Ile⁸)-ангиотензин 11.

Стадия 1. Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-OMe.

15 1,5 г (0,8 ммоль) Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-OMe (например 1, стадия 1) растворяют в 6 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане, через 20 мин добавляют

20 безводный эфир, выпавший продукт отфильтровывают, Полученный хлоргидрат свободного гептапептида ($R_f^{(5)}=0,7$) растворяют в 10 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до

25 pH 8 и 0,46 г (1,17 ммоль) пентафторфенилового эфира Z-OGly. Через 30 мин добавляют к смеси 30 мл хлороформа, промывают 10%-ным водным раствором лимонной кислоты, 1 н. раствором соляной кислоты и водой, сушат над

30 сульфатом натрия и упаривают. Получают 1,05 г (93% от теоретического) Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-OMe; Т.пл. 140-145°C; $R_f^{(3)}=0,24$.

35 Стадия 2. Удаление защитных групп.

1,05 г (0,74 ммоль) Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ile-OMe растворяют в 5 мл диметилформамида, к раствору добавляют 2,3 мл 2-меркаптоэтанола, через 2 ч добавляют безводный эфир, выпавший продукт отфильтровывают, промывают эфиром. Получают 0,85 г (85% от теоретического) Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Ile-OMe ($R_f^{(4)}=0,40$).

45 0,75 г (0,6 ммоль) этого продукта растворяют в 20 мл смеси метанол - уксусная кислота - вода (5:1:1), добавляют 0,8 г 10%-ного палладия на активированном угле и через раствор в течение 18 ч при интенсивном перемешивании пропускают водород.

50 Затем катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Остаток смешивают с водным этанолом и упаривают. Операцию повторяют несколько раз. Затем остаток растирают с безводным эфиром, отфильтровывают и сушат.

Получают 0,48 г (82% от теоретического) метилового эфира (OGly¹Ile⁸) ангиотензина 11, который очищают как описано выше.

Конечный продукт имеет следующие характеристики: $R_f^{(7)}=0,29$; $R_f^{(8)}=0,72$; $R_f^{(9)}=0,60$.

Аминокислотный анализ: Pro 1,0 (1); Val 1,0 (1); Ile 1,7 (2); Tyr 0,88 (1); His 1,02 (1); Arg 0,96 (1).

Пример 3. Метилловый эфир (Sar¹, Thr(Me)⁸)-ангиотензина 11.

Стадия 1. Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe 0,68 г (4,5 ммоль) метилового

эфира 0-метил-треонина растворяют в 10 мл хлороформа и добавляют 2,28 г (6 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-пролина. Раствор выдерживают 30 мин при постоянном pH 8 и упаривают. Остаток растворяют в этилацетате, добавляют 0,22 мл N,N-диметиламиноэтиламина и через 15 мин промывают 10%-ным водным раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором хлористого натрия, 1 н. раствором соляной кислоты и водой, сушат над сульфатом натрия и упаривают. Полученный защищенный дипептид ($R_f^{(2)}=0,76$) растворяют в 3 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане. Через 15 мин добавляют безводный эфир и упаривают. Полученный хлоргидрат свободного дипептида ($R_f^{(3)}=0,18$) растворяют в 10 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH и 2,95 г (5 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-N^m-динитрофенил-гистидина. Раствор выдерживают 30 мин при pH 8 упаривают и остаток растворяют в этилацетате. К раствору добавляют 0,11 мл N,N-диметиламиноэтиламина, через 10 мин промывают 10%-ным водным раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором хлористого натрия и водой, сушат над сульфатом натрия и упаривают. Полученный защищенный трипептид ($R_f^{(4)}=0,3$) растворяют в 10 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,0 г (5 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-изолейцина, выдерживают 30 мин при pH 8 и упаривают. Остаток растворяют в этилацетате. Раствор промывают, сушат и упаривают. Остаток растирают со смесью эфир - гексан 3:7 и отфильтровывают. Полученный тетрапептид ($R_f^{(2)}=0,28$) растворяют в 7 мл 8 н. раствора соляной кисло-

ты в диоксане. Через 15 мин добавляют безводный эфир, выпавший продукт отфильтровывают и промывают эфиром. Полученный продукт ($R_f^{(5)}=0,27$)

растворяют в 10 л диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и

2,7 г (5 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-0-бензил-тирозина, выдерживают 30 мин при pH 8, упаривают, остаток растворяют в этилацетате. К

полученному раствору добавляют 0,11 мл N,N-диметилэтиламина и через 15 мин промывают 10%-ным водным раствором лимонной кислоты, насыщен-

ным раствором хлористого натрия и водой, сушат над сульфатом натрия и упаривают. Полученный в остатке за-

щищенный пентапептид ($R_f^{(2)}=0,51$) растирают с безводным эфиром, отфиль-

тровывают и растворяют в 5 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане,

через 15 мин добавляют безводный эфир, выпавший продукт отфильтровы-

вают, промывают эфиром. Полученный

хлоргидрат свободного пентапептида ($R_f^{(5)}=0,48$) растворяют в 20 мл ди-

метилформамида, добавляют триэтил-

амин до pH 8 и 1,9 г (9 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-валина.

Раствор выдерживают 30 мин при pH 8, упаривают, остаток растворяют в хло-

роформе, промывают сушат и упаривают. Остаток растирают с безводным

эфиром и отфильтровывают. Полу-

ченный защищенный гексапептид ($R_f^{(2)}=0,44$) растворяют в 10 мл 8 н.

раствора соляной кислоты в диоксане и через 15 мин добавляют без-

водный эфир, выпавший продукт отфиль-

тровывают и промывают эфиром. Полу-

ченный хлоргидрат свободного гекса-

пептида ($R_f^{(4)}=0,36$) растворяют в 15 мл диметилформамида, добавляют

триэтиламин до pH 8 и 2,25 г (5 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-N^G-

-нитроаргинина. Раствор выдерживают 1 ч при pH 8, разбавляют хлороформом

и обрабатывают как описано выше. Полученный в остатке продукт расти-

рают с этанолом и отфильтровывают.

Получают 3,3 г (91% от теоретического выхода, рассчитанного на треонин) Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe. Т.пл. 188-193°C; $R_f^{(3)}=0,38$; $R_f^{(4)}=0,87$.

1,95 г (1,5 ммоль) вышеуказанного метилового эфира защищенного геп-

тапептида растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диокса-

не и через 20 мин осаждают добавлением безводного эфира продукт, который отфильтровывают и промывают эфиром. Полученный хлоргидрат свободного гептапептида ($R_f^{(3)}=0,20$;) растворяют в 15 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 0,87 г (2,25 ммоль) пентафторфенилового эфира Z-Sar.

Раствор выдерживают 1 ч при pH 8, разбавляют хлороформом и обрабатывают как описано выше.

Получают 1,85 г (87% от теоретического) метилового эфира защищенного октапептида Z-Sar-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe. Т.пл. 202-208°C; $R_f^{(21)}=0,20$; $R_f^{(4)}=0,86$.

Стадия 2. Удаление защитных групп.

1,85 г (1,4 ммоль) Z-Sar-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe растворяют в 8 мл диметилформамида, к раствору добавляют 2,6 мл 2-меркаптоэтанола, через 1 ч добавляют безводный эфир. Выпавший продукт отфильтровывают и промывают эфиром. Получают 1,6 г Z-Sar-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Thr(Me)-OMe, ($R_f^{(4)}=0,52$). Полученный продукт растворяют в 30 мл смеси метанол - уксусная кислота - вода (5:1:1), добавляют катализатор (10%-ный палладий на активированном угле) и при интенсивном перемешивании в течение 30 ч пропускают водород. Затем катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Остаток растирают со смесью эфир - этанол (2:1) и отфильтровывают.

Получают 0,98 г (83% от теоретического) метилового эфира (Sar¹, Thr(Me)⁸)-ангиотензина 11, который очищают как описано выше.

Конечный продукт имеет следующие характеристики: $R_f^{(7)}=0,29$; $R_f^{(8)}=0,55$; $R_f^{(9)}=0,27$.

Аминокислотный анализ: His 1,03(1); Arg 0,95 (1); Ile 0,93 (1); Pro 1,03 (1); Val 1,15 (1); Ile 1,03 (1); Tyr 0,9 (1); Sar 1,0 (1).

Пример 4. Метилловый эфир (OGly¹, Thr(Me)⁸)-ангиотензина 11

Стадия 1. Z-OGly-Arg(NO_2)-Val-Thr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Thr(Me)-OMe.

0,62 г (0,47 ммоль) Boc-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe

(пример 3, стадия 1) растворяют в 4 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 15 мин осаждают

продукт добавлением безводного эфира, отфильтровывают и промывают эфиром. Полученный хлоргидрат свободного гептапептида ($R_f^{(5)}=0,35$) растворяют в 10 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 0,8 г (2 ммоль) пентафторфенилового эфира Z-OGly. Раствор выдерживают 1 ч при pH 8, разбавляют 30 мл хлороформа и обрабатывают как описано выше. Остаток растирают со смесью эфир - этанол (9:1) и отфильтровывают.

Получают 0,60 г (90% от теоретического) метилового эфира защищенного октапептида Z-OGly-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe. Т.пл. 158-162°C; $R_f^{(31)}=0,44$.

Стадия 2. Удаление защитных групп.

0,6 г (0,42 ммоль) Z-OGly-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr(Me)-OMe растворяют в 2 мл диметилформамида, к раствору добавляют 1,2 мл 2-меркаптоэтанола, через 1 ч добавляют безводный эфир, выпавший продукт отфильтровывают, растворяют в метаноле. Раствор обрабатывают активированным углем, фильтруют и упаривают. Остаток растирают с эфиром и отфильтровывают. Получают 0,46 г Z-OGly-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Thr(Me)-OMe. $R_f^{(41)}=0,16$; $R_f^{(21)}=0,52$.

Продукт растворяют в 25 мл смеси метанол - уксусная кислота - вода (5:1:1), добавляют 0,3 г 10%-ного палладия на активированном угле и при интенсивном перемешивании пропускают в течение 17 ч водород. Затем катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Остаток смешивают с водным этанолом и упаривают. Операцию повторяют несколько раз.

Получают 0,32 г (91% от теоретического) метилового эфира (OGly¹, Ala)-ангиотензина 11, который очищают как описано выше.

Конечный продукт имеет следующие характеристики: $R_f^{(7)}=0,22$; $R_f^{(8)}=0,73$; $R_f^{(9)}=0,56$.

Аминокислотный анализ: Thr 0,02(1) Pro 1,03 (1); Val 1,0 (1); His 1,0(1) Arg 1,0 (1).

Пример 5. Метилловый эфир (OGly¹, Thr⁸)-ангиотензина 11.

Стадия 1. Boc-Arg(NO_2)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr-OMe.

3,8 г (20 ммоль) метилового эфира O-метил-тирозина хлоргидрата растворяют в 50 мл хлороформа, добавляют 2,3 мл (20 ммоль) триэтиламин

на и 3,8 г (10 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-пролина.

Раствор выдерживают при постоянном pH 1 ч и обрабатывают как описано выше. Полученный защищенный дипептид ($R_F^{(3)}=0,77$) растворяют в 20 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане, через 15 мин добавляют безводный эфир, выпавший продукт отфильтровывают и промывают эфиром. Полученный продукт ($R_F^{(5)}=0,2$) растворяют в 30 мл хлороформа, добавляют триэтиламин до pH 8 и 4,7 г (8 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-N^m-динитрофенил-гистидина. Раствор выдерживают 1 ч при pH 8 и обрабатывают как указано выше. Полученный в остатке защищенный трипептид ($R_F^{(5)}=0,47$) растворяют в 20 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 15 мин осаждают продукт, добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного трипептида ($R_F^{(5)}=0,23$) растворяют в 20 мл смеси хлороформ - диметилформамид (5:1), добавляют триэтиламин до pH 8 и 4,0 г (10 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-изолейцина. Раствор выдерживают 30 мин при pH 8, обрабатывают. Остаток растирают с гексаном и отфильтровывают.

Полученный защищенный тетрапептид ($R_F^{(3)}=0,45$) растворяют в 15 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 15 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного тетрапептида ($R_F^{(5)}=0,25$) растворяют в 30 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,05 г (3,8 ммоль) пентафторфенилового эфира O-бензил-тирозина. Раствор выдерживают 30 мин при pH 8, упаривают, остаток растворяют в этилацетате. К полученному раствору добавляют 0,11 мл N,N-диметиламиноэтиламина и через 15 мин раствор обрабатывают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный пентапептид ($R_F^{(3)}=0,57$) растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане. Через 15 мин продукт осаждают добавлением безводного эфира, отфильтровывают и промывают эфиром.

Полученный продукт ($R_F^{(5)}=0,27$) растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 1,75 г (4,5 ммоль) пентафторфенило-

го эфира БОК-валина. Раствор выдерживают 1 ч при pH 8 и упаривают. Остаток растворяют в хлороформе и раствор обрабатывают. Остаток растирают с эфиром, отфильтровывают и промывают эфиром. Полученный защищенный гексапептид ($R_F^{(5)}=0,55$) растворяют в 8 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане, через 15 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Продукт отфильтровывают, промывают эфиром. Полученный хлоргидрат свободного гексапептида ($R_F^{(5)}=0,23$) растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 1,8 г (4 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-N^G-нитроаргинина. Раствор выдерживают 1 ч при pH 8, упаривают, остаток растворяют в хлороформе, раствор обрабатывают сушат и упаривают. Остаток растирают со смесью эфир - этанол (9:1), отфильтровывают и промывают вышеуказанной смесью.

Получают 2,7 г (26% от теоретического выхода в расчете на гистидин) Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr-OMe. Т.пл. 190-195°C (разложения); $R_F^{(4)}=0,47$.

Стадия 2. Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr-OMe. 1,7 г (1,4 ммоль) Boc-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr-OMe растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане, через 15 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Продукт отфильтровывают и промывают эфиром. Полученный хлоргидрат свободного гептапептида ($R_F^{(3)}=0,21$) растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 0,82 г (2,1 ммоль) пентафторфенилового эфира Z-OGly.

Раствор выдерживают 30 мин при pH 8, разбавляют 40 мл хлороформа, промывают 1 н. раствором соляной кислоты и водой, сушат и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают.

Получают 1,6 г (87% от теоретического) метилового эфира защищенного октапептида Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr-OMe. Т.пл. 188-194°C; $R_F^{(4)}=0,48$.

Стадия 3. Удаление защитных групп.

1,6 г (1,2 ммоль) Z-Sar-Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Thr-OMe растворяют в 5 мл диме-

тилформамида, добавляют 3,8 мл 2-меркаптоэтанола. Через 1 ч продукт осаждают добавлением безводного эфира. Продукт отфильтровывают и промывают эфиром, растворяют в метаноле и осаждают добавлением эфира.

Получают 1,3 г (94% от теоретического) Z-OGly-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Thr-OMe. $R_f^{(4)}=0,35$; $R_f^{(5)}=0,72$.

Полученный продукт растворяют в смеси метанол - уксусная кислота - вода (5:1:1), добавляют 0,6 г 10%-ного палладия на активированном угле и при интенсивном перемешивании пропускают в течение 17 ч водород. Затем катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Остаток смешивают с водным этанолом и упаривают. Операцию повторяют несколько раз. Остаток растирают с эфиром, отфильтровывают и промывают эфиром.

Получают 0,64 г метилового эфира (OGly¹, Thr⁸)-ангиотензина 11, который очищают как описано выше.

Конечный продукт имеет следующие характеристики: $R_f^{(7)}=0,22$; $R_f^{(8)}=0,73$; $R_f^{(9)}=0,56$.

Аминокислотный анализ: Thr 0,92(1) Pro 1,03(1); Val 1,0(1); Ile 1,5(1); Tyr 0,7(1); His 1,0(1); Arg 1,0(1)

Пример 6. Метилловый эфир (Sar¹, Ala⁸)-ангиотензин 11.

Стадия 1. Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ala-OMe.

0,7 г (5 ммоль) хлоргидрата метилового эфира аланина растворяют в 20 мл хлороформа, добавляют 0,7 мл триэтиламина и 1,14 г (3 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-пролина. Раствор выдерживают при постоянном pH 30 мин и обрабатывают как описано выше. Полученный защищенный дипептид ($R_f^{(21)}=0,61$) растворяют в 5 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане, через 10 мин разбавляют безводным эфиром и упаривают. Полученный хлоргидрат свободного дипептида ($R_f^{(51)}=0,32$) растворяют в 20 мл хлороформа, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,7 г (4,5 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-N^m-динитрофенилгистидина. Раствор выдерживают 1 ч при pH 8, добавляют 0,33 мл N,N-диметиламиноэтиламина и через 15 мин обрабатывают, сушат и упаривают. Полученный защищенный трипептид ($R_f^{(21)}=0,27$) растворяют в 10 мл

8 н. раствора соляной кислоты в диоксане, через 15 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного трипептида ($R_f^{(31)}=0,48$) отфильтровывают, промывают эфиром и растворяют в смеси хлороформ - диметилформамид (2:1), добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,4 г (6 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-изолейцина. Раствор выдерживают 30 мин при pH 8 и упаривают. Остаток растворяют в этилацетате и полученный раствор обрабатывают как описано выше, сушат и упаривают.

Остаток растирают со смесью эфир-гексан (1:9) и отфильтровывают. Полученный защищенный тетрапептид ($R_f^{(21)}=0,29$) растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 10 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного тетрапептида ($R_f^{(51)}=0,67$) отфильтровывают, промывают эфиром, растворяют в смеси хлороформ - диметилформамид (2:1), прибавляют к раствору триэтиламин до pH 8 и 1,78 г (3,3 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-0-бензил-тирозина. Раствор выдерживают 15 мин при pH 8 и упаривают. Остаток растворяют в этилацетате и раствор обрабатывают, сушат и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный пентапептид ($R_f^{(21)}=0,33$) растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 10 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного пентапептида отфильтровывают и растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 1,55 г (4 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-валина. Раствор выдерживают 1 ч при pH и упаривают. Остаток растворяют в хлороформе и раствор обрабатывают сушат и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный гексапептид ($R_f^{(21)}=0,35$) растворяют в 8 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 20 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного гексапептида ($R_f^{(31)}=0,75$) отфильтровывают, промывают эфиром, растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,64 г (6 ммоль) пентафтор-

Остаток растирают со смесью эфир-гексан (1:9) и отфильтровывают. Полученный защищенный тетрапептид ($R_f^{(21)}=0,29$) растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 10 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного тетрапептида ($R_f^{(51)}=0,67$) отфильтровывают, промывают эфиром, растворяют в смеси хлороформ - диметилформамид (2:1), прибавляют к раствору триэтиламин до pH 8 и 1,78 г (3,3 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-0-бензил-тирозина. Раствор выдерживают 15 мин при pH 8 и упаривают. Остаток растворяют в этилацетате и раствор обрабатывают, сушат и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный пентапептид ($R_f^{(21)}=0,33$) растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 10 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного пентапептида отфильтровывают и растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 1,55 г (4 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-валина. Раствор выдерживают 1 ч при pH и упаривают. Остаток растворяют в хлороформе и раствор обрабатывают сушат и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный гексапептид ($R_f^{(21)}=0,35$) растворяют в 8 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 20 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного гексапептида ($R_f^{(31)}=0,75$) отфильтровывают, промывают эфиром, растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,64 г (6 ммоль) пентафтор-

Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный пентапептид ($R_f^{(21)}=0,33$) растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 10 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного пентапептида отфильтровывают и растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 1,55 г (4 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-валина. Раствор выдерживают 1 ч при pH и упаривают. Остаток растворяют в хлороформе и раствор обрабатывают сушат и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный гексапептид ($R_f^{(21)}=0,35$) растворяют в 8 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 20 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного гексапептида ($R_f^{(31)}=0,75$) отфильтровывают, промывают эфиром, растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,64 г (6 ммоль) пентафтор-

Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный пентапептид ($R_f^{(21)}=0,33$) растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 10 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного пентапептида отфильтровывают и растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 1,55 г (4 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-валина. Раствор выдерживают 1 ч при pH и упаривают. Остаток растворяют в хлороформе и раствор обрабатывают сушат и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный гексапептид ($R_f^{(21)}=0,35$) растворяют в 8 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 20 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного гексапептида ($R_f^{(31)}=0,75$) отфильтровывают, промывают эфиром, растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,64 г (6 ммоль) пентафтор-

Остаток растворяют в хлороформе и раствор обрабатывают сушат и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный гексапептид ($R_f^{(21)}=0,35$) растворяют в 8 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 20 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного гексапептида ($R_f^{(31)}=0,75$) отфильтровывают, промывают эфиром, растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,64 г (6 ммоль) пентафтор-

Остаток растворяют в хлороформе и раствор обрабатывают сушат и упаривают. Остаток растирают с безводным эфиром и отфильтровывают. Полученный защищенный гексапептид ($R_f^{(21)}=0,35$) растворяют в 8 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане и через 20 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного гексапептида ($R_f^{(31)}=0,75$) отфильтровывают, промывают эфиром, растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 2,64 г (6 ммоль) пентафтор-

фенилового эфира БОК-NG-нитроаргинина. Раствор выдерживают 1 ч при pH 8, разбавляют 60 мл хлороформа, обрабатывают, сушат и упаривают. Остаток растирают со смесью этанол - эфир (1:3), отфильтровывают и промывают. Полученный защищенный гексапептид ($R_f^{(3)}=0,35$) растворяют в 10 мл 8 н. раствора соляной кислоты в диоксане, через 15 мин осаждают продукт добавлением безводного эфира. Полученный хлоргидрат свободного гептапептида ($R_f^{(4)}=0,15$) отфильтровывают, промывают эфиром, растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин до pH 8 и 1,27 г (3,3 ммоль) пентафторфенилового эфира Z-Sar.

Раствор выдерживают 15 мин при pH 8, разбавляют 60 мл хлороформа и обрабатывают, сушат и упаривают. Остаток растирают с 25 мл этанола, отфильтровывают и промывают этанолом.

Получают 1,37 г (33% от теоретического выхода в расчете на пролин) Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ala-OMe. Т.пл. 192-196°C $R_f^{(4)}=0,70$.

Стадия 2. Удаление защитных групп. 1,37 г (1 ммоль) Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Ala-OMe растворяют в 3 мл диметилформамида, добавляют 1,9 мл 2-меркаптоэтанола и через 1 ч добавляют безводный эфир. Выпавший продукт отфильтровывают и промывают эфиром.

Получают 1,2 г (99% от теоретического) Z-Sar-Arg(NO₂)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His-Pro-Ala-OMe ($R_f^{(4)}=0,20$).

Полученный продукт растворяют в 20 мл смеси метанол - уксусная кислота - вода (5:1:1), добавляют 0,6 г 10%-ного палладия на активированном угле и при интенсивном перемешивании в течение 20 ч пропускают водород. Затем катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Остаток смешивают с водным этанолом и упаривают. Операцию повторяют несколько раз. Остаток растирают со смесью этанол - эфир (1:1) и отфильтровывают.

Получают 0,7 г (75% от теоретического) метилового эфира (Sar¹, Ala⁸)-ангиотензина II, который очищают как описано выше.

Конечный продукт имеет следующие характеристики: $R_f^{(7)}=0,23$; $R_f^{(8)}=0,54$; $R_f^{(9)}=0,27$.

Аминокислотный анализ: His 0,97(1), Arg 1,03(1); Pro 1,06(1); Val 1,03(1); Ile 0,98(1); Tyr 0,6(1); Sar 1,0(1)

Описываемые метиловые эфиры октапептидов общей формулы изучены как антагонисты природного гормона ангиотензина II.

Антагонистическое действие новых соединений общей формулы (I) исследуют на наркотизированных котах. При исследовании блуждающие нервы животных подрезают на обеих сторонах шеи и после блокирования нервных узлов вводят животным гипертензии ("Ciba") путем вливания со скоростью 0,5 г/кг/мин. После стабилизации повышенного кровяного давления животному вводят внутривенно или подкожно исследуемое вещество в физиологическом растворе и измеряют вызванное введением вещества уменьшение кровяного давления. Снижение кровяного давления регистрируется в миллиметрах ртутного столба и в процентах начального значения давления, измеренного до введения исследуемого вещества. Под продолжительностью действия отдельных исследований соединений понимается время до момента значительного понижения кровяного давления ($P=5\%$). Для сравнения приведены данные, полученные при использовании известного антагониста ангиотензина II - сарализина (1-(N-метилглицин)-5-L-валин, 8-аланин)-ангиотензина II) в тех же условиях.

Полученные результаты представлены в таблице.

Из таблицы следует, что предлагаемые соединения при внутривенном введении существенно снижают кровяное давление.

При подкожном введении метиловые эфиры октапептидов общей формулы (I) также проявляют способность снижать экспериментально вызванное повышение кровяного давления.

Указанные соединения могут найти применение в терапии как средства, понижающие кровяное давление.

Исследуемое вещество	Доза	Изменение кровяного давления при внутривенном введении, %	Продолжительность, мин
Метилловый эфир (Sar ¹ , Ile ⁸)-ангиотензина 11	20	21	25
	40	20	38
Метилловый эфир (Sar ¹ , Ala ⁸)-ангиотензина 11	10	18	12
	20	29	18
Метилловый эфир (Sar ¹ , Thr (Me ⁸)-ангиотензина 11	20	12	12
Метилловый эфир (OGly ¹ , Ile ⁸)-ангиотензина 11	20	27	42
Сарализин	10	32	15

Редактор М.Келемеш

Составитель О.Галкин
Техред Т.Фанта

Корректор В.Гирняк

Заказ 6961/60

Тираж 418

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4