

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

53176

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 27.VI.1964 (P 105 015)

Pierwszeństwo: 28.VI.1963 Szwajcaria

Opublikowano: 20.VII.1967

Kl. 12 q 6/01

MKP C 07 c

103/52

UKD

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Współtwórcy wynalazku: dr Roger Boissonnas, dr Stephan Guttman,
dr Janos Pless

Właściciel patentu: Sandoz A.G. Bazylea, (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania nowego polipeptydu

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowego polipeptydu stanowiącego amid L-serylo-L-tyrozylo- L-serylo- L-norleucylo- L-glutamylo- L-histydylo- L-fenylalaninylo- L-arginylo- L-tryptofanylo- glicylo- L-lizylo- L-prolilo- L-waliloglicylo- L-lizylo- L-lizylo- L-arginylo- L-arginylo L-prolilo- L-walilo- L-lizylo- L-walilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny i jego addycyjnych soli z kwasami.

Polipeptyd może być otrzymywany znanymi metodami syntezy tego rodzaju związków, przy czym aminokwasy można dołączać kolejno lub po uprzednim zsyntetyzowaniu peptydów o mniejszych cząsteczkach, które następnie łączy się z sobą.

Wyżej wymieniony polipeptyd można na przykład otrzymać traktując pochodną henekozapeptydu, a mianowicie amid N-karbobenzoksy- γ -O-III-rzęd. butylo- L-glutamylo- L-histydylo- L-fenylalaninylo- (guanido)- N-tozylo- L-arginylo- L-tryptofanylo- L-glicylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-prolilo- L-waliloglicylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- (guanido)- N-tozylo- L-arginylo- (guanido)- N-tozylo- L-arginylo- L-prolilo- L-walilo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-walilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny sodem w bezwodnym, ciekłym amoniaku, kondensując otrzymany nowy amid L-glutamylo- L-histydylo- L-fenylalaninylo- L-arginylo- L-tryptofanylo- L-glicylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-prolilo- L-

2

-waliloglicylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-arginylo- L-arginylo- L-prolilo- L-walilo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-walilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny z funkcjonalną pochodną kwasową czteropeptydu N-A-L-serylo- L-tyrozylo- L-serylo- L-norleucyny, w której A oznacza grupę ochronną, stosowaną do ochrony grupy aminowej, korzystnie grupę karbobenzylloksylo- odszczepialną przez uwodornienie, przez traktowanie bromowodorem w kwasie trójfluorooctowym, metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, lub przez kwaśną hydrolizę, grupę karboalkiloksylo- odszczepialną przez kwaśną hydrolizę, grupę trójfluoroacetylo- odszczepialną przez zmydlenie lub traktowanie hydrazyną, grupę acetylo- chloroacetylo- lub formylo- odszczepialną przez kwaśną hydrolizę, grupę karbo III-rzęd.-butoksylo- lub p-nitro-karbo-benzoksylo- odszczepialną przez kwaśną hydrolizę lub traktowanie bromowodorem w kwasie trójfluorooctowym lub kwasem trójfluorooctowym, grupę trójfenylometylo- odszczepialną za pomocą kwasu trójfluorooctowego, bromowodoru w kwasie trójfluorooctowym, przez kwaśną hydrolizę lub traktowanie metalem alkalicznym w ciekłym amoniaku, a grupa karboksylowa reszty norleucyny występuje w postaci funkcjonalnej pochodnej kwasowej, zdolnej do reakcji z wolnymi grupami aminowymi, po czym wszystkie grupy ochronne otrzymanego nowego pentakoz-

peptydu o wzorze amidu N-A-L-serylo- L-tyrozylo- L-serylo- L-norleucylo- L-glutamyl- L-histydyl- L-fenylalanilo- L-arginylo- L-tryp-
 tofanylo-glicylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-pro-
 lilo- L-walilo-glicylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- ϵ -
 N-formylo- L-lizylo- L-arginylo- L-arginylo- L-
 prolilo- L-walilo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-wa-
 lilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny, w którym
 A ma wyżej podane znaczenie, a formyl oznacza
 odszczepialną przez kwaśną hydrolizę grupę for-
 mylową, traktuje się odpowiednimi środkami od-
 szczepiającymi poszczególne grupy ochronne,
 przy czym proces można przeprowadzić jedno-
 stopniowo, ewentualnie wielostopniowo. Otrzy-
 many polipeptyd przeprowadza się ewentualnie
 w ~~sol~~ ^{znanym} sposobem przez reakcję z kwa-
 sem organicznym lub nieorganicznym.

Jako funkcjonalną pochodną kwasową cztero-
 peptydu N-A-L-serylo- L-tyrozylo- L-serylo- L-
 norleucyny stosuje się na przykład azydek,
 mieszane bezwodniki, albo produkt reakcji kwa-
 su dwucykloheksylokarbodwuimidem lub karbo-
 nylodwuimidazolem.

Trudności, które napotyka się w toku syntezy
 nowego polipeptydu polegają przede wszystkim
 na doborze grup ochronnych. Systematyczne ba-
 danie nowych kombinacji grup ochronnych do-
 prowadziło do nieoczekiwanego stwierdzenia, że
 w toku syntezy można stosować grupy tozylowe
 do ochrony grup guanidowych reszty argininy,
 a te przed ostatnią kondensacją odszczepić przez
 traktowanie sodem w ciekłym amoniaku bez
 równoległe przebiegającego rozerwania wiązania
 między resztą lizyny w położeniu 11 a resztą
 proliny w położeniu 12, o ile grupa ϵ -aminowa
 reszty lizyny w położeniu 11 jest chroniona przez
 grupę formylową.

W toku syntezy łańcucha peptydowego stosuje
 się do odbudowy korzystnie estry 2, 4, 5-trój-
 chlorofenylowe karbobenzoksyaminokwasów lub
 ewentualnie karbobenzoksypeptydy.

Chroniony pentakozapeptyd może być jednak
 otrzymywany nie tylko w wyżej opisany sposób,
 lecz również przez kondensację dwóch różnych
 polipeptydów, lub jednego polipeptydu i amino-
 kwasu w postaci ich chronionych pochodnych.

Produkty wyjściowe do wytwarzania chronio-
 nych pochodnych pentakozapeptydu, jeżeli były
 one dotychczas nieznane, otrzymuje się metodami
 znanymi w chemii peptydów, przy czym poszcze-
 gólne aminokwasy łączy się ze sobą pojedynczo
 lub po uprzednim utworzeniu peptydów o
 mniejszych cząsteczkach.

Wytwarzany według wynalazku pentakozapep-
 tyd można również otrzymywać i stosować w po-
 staci jego soli. Jako takie sole wchodzi w rachubę
 sole z organicznymi kwasami takimi jak kwas
 octowy, propionowy, glikolowy, mlekowy, piro-
 gronowy, malonowy, bursztynowy, maleinowy,
 fumarowy, winowy, cytrynowy, benzoesowy, cy-
 namonowy, salicylowy, 2-fenoksy- lub 2-acetok-
 sybenzoesowy, migdałowy, metanosulfonowy,
 etanosulfonowy, hydroksyetasanosulfonowy, benze-
 no- lub toluenosulfonowy, naftalenosulfonowy,
 sulfanilowy, jak również sole z nieorganicznymi

kwasami jak chlorowcowodorowy, na przykład
 kwas solny lub bromowodorowy, kwas azotowy,
 tiocyjanowy, siarkowy i fosforowy.

Do utworzenia soli można również stosować
 kwasowe makrocząsteczki, jak na przykład na-
 turalne kwasy poliuronowe (jak na przykład kwas
 poligalakturenowy, pektyny cytrusowe, substancje
 alginowe, kwasowe mukopolisacharydy jak na
 przykład heparyna, siarczan chondrytyny), jak
 również uzyskiwane syntetycznie lub mikrobio-
 logicznie pochodne celulozy zawierające grupy
 kwasowe) jak na przykład: karboksymetylo ce-
 luloza lub siarczan dekstranu), skrobia lub inne
 polisacharydy.

Otrzymany według wynalazku pentakozapeptyd
 i jego sole posiadają takie same biologiczne i
 lecznicze właściwości jak naturalna kortikotropi-
 na (ACTH). Tak na przykład można go stosować
 przy leczeniu reumatyzmu stawowego, astmy
 oskrzelowej, zapalenia stawów, alergii, artretyz-
 mu, pokrzywki, wstrząsu uczuleniowego, Coliti-
 sulcerose Lupus erythematodes, zapaleń, Derma-
 tis exfoliativa, białaczki limfatycznej, skleroder-
 mii, egzemy i stanów zatrucia przy chronicznym
 alkoholizmie.

Wykazuje on taką samą aktywność (mierzoną
 metodą Saver'a) jak naturalna kortikotropina.
 Podczas gdy naturalną kortikotropinę oczyszcza
 się za pomocą żmudnych i kosztownych metod
 i praktycznie zawsze jeszcze zawiera wysoko-
 cząsteczkowe zanieczyszczenia białkowe, które
 mogą powodować niebezpieczne reakcje uczule-
 niowe, nowy syntetyczny związek otrzymuje się
 bezpośrednio w wysokim stopniu czystości i bez
 jakichkolwiek zanieczyszczeń substancjami biał-
 kowymi.

Prócz tego przy wytwarzaniu nowego synte-
 tycznego związku, nie potrzeba mieć do dyspo-
 zycji gruczołów przysadki mózgowej, które moż-
 na otrzymać tylko w ograniczonych ilościach i
 które są bardzo drogie.

Szczególnie korzystne jest to, że nowy związek
 w położeniu 4 nie posiada, jak naturalny ACTH,
 reszty metioniny, która jak wiadomo ulega łat-
 wo utlenieniu i wskutek tego hormon przekształ-
 ca się w postać nieaktywną, lecz zawiera resztę
 norleucyny, która posiada takie same właściwości
 przestrzenne jak reszta metioniny, natomiast jest
 odporna na utlenienie.

Ponadto nowy związek posiada w położeniu 25
 resztę amidu waliny, która w naturalnym ACTH
 w tym położeniu nie występuje.

Ta reszta amidu waliny na końcu grupy kar-
 boksylowej chroni łańcuch peptydowy od roz-
 padu enzymatycznego. Nowy związek posiada
 dzięki temu w porównaniu do ACTH podwyż-
 szoną trwałość, co jest szczególnie korzystne przy
 stosowaniu podskórnym lub domięśniowym.

Nowy polipeptyd w postaci wolnej zasady lub
 soli organicznego lub nieorganicznego kwasu,
 może być stosowany jako środek leczniczy sam,
 albo też w postaci odpowiedniej do podawania
 doustnego, pozajelitowego, dojelitowego lub do-
 nosowego.

Dla otrzymania leku w odpowiedniej postaci stosuje się nieorganiczne lub organiczne farmakologicznie obojętne substancje pomocnicze. Jako substancje pomocnicze stosuje się na przykład do tabletek i drażetek: cukier mlekowy, skrobię, talk, kwas stearynowy, do syropów: cukier trzcinowy, cukier inwertowany, roztwory glukozy i inne, do preparatów do iniekcji wodę, alkohole, glicerynę, oleje roślinne i tym podobne, do czopków — naturalne lub utwardzone oleje, woski i inne.

Prócz tego mogą one zawierać odpowiednie środki konserwujące, stabilizujące, zwilżające, rozpuszczalniki, substancje słodzące i barwiące, zapachowe i inne.

Nowy związek może być również podawany podobnie jak naturalny ACTH w postaci preparatu o przedłużonym działaniu.

Wytworzony sposobem według wynalazku pentakozapeptyd i jego sole mogą również znaleźć zastosowanie jako produkty pośrednie do wytwarzania preparatów farmaceutycznych.

W dalszym tekście zastosowano następujące skróty:

CBO	= karbobenzoksy
Tri	= trityl = trójfenylometyl
(For)	= formyl (w grupie aminowej lizyny)
(Tos)	= tozyl = p-toluenosulfonyl (w grupie guanidowej argininy)
-OCP	= grupa 2, 4, 5-trójchlorofenoksykowa
-OTP	= grupa III-rzęd. butyloksylowa
-OMe	= grupa metoksykowa
-OET	= grupa etoksykowa
-Arg	= grupa L-arginylowa
-Glu	= L-glutamyl
-Gli	= glicyl
-His	= L-histydyl
-Liz	= L-lizyl
-Nle	= L-norleucyl
-Fen	= L-fenylalaninyl
-Pro-	= L-prolin
-Ser-	= L-seryl
-Try-	= tryptofaninyl
-Tyr-	= tyrozyl
-Wal-	= L-walil

W następujących przykładach temperatury podane są w stopniach Celsjusza.

Syntezę nowego polipeptydu przedstawiono schematycznie na rysunkach (fig. fig. 1—6).

Przykład I. Ester 2, 4, 5-trójchlorofenylowy O, N-dwukarbobenzoksy- L-tyrozyny (CBO-/CBO/Tyr-OCP).

45 g O,N-dwukarbobenzoksy- L-tyrozyny i 24 g 2, 4, 5-trójchlorofenolu rozpuszcza się w 200 ml chloroformu i 200 ml acetonitrylu, oziębia się do temperatury -10°C dodaje 25 g dwucykloheksylokarbodwuimidu, pozostawia się na 3 godziny w temperaturze 20°C , przesącza, przesącz odparowuje, pozostałość roztwarza w 650 ml wrzącego etanolu oziębia i przesącza. Otrzymuje się 57 g estru 2, 4, 5-trójchlorofenylowego O, N-karbobenzoksy- L-tyrozyny. Temperatura topnienia 144°C (α) $\frac{21}{D}$ = 36° w dwumetyloformamidzie.

Przykład II. Ester 2, 4, 5-trójchlorofenylowy α -N-karbobenzoksy- ϵ -N-formylo- L-lizyny (CBO-(For/Liz-OCP).

157 g α -N-karbobenzoksy- ϵ -N-formylo- L-lizyny i 117 g 2, 4, 5-trójchlorofenolu rozpuszcza się w 900 ml chloroformu i 90 ml acetonitrylu oraz dodaje się w temperaturze -10°C , 103 g dwucykloheksylokarbodwuimidu. Wytrząsa się w ciągu 2 godzin i odsącza mocznik. Po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość przekrystalizowuje się z etanolu. Otrzymuje się 224 g estru 2,4,5-trójchlorofenylowego α -N-karbobenzoksy- ϵ -N-formylo- L-lizyny.

Temperatura topnienia $142-144^{\circ}\text{C}$. (α) $\frac{21}{D}$ = -18° w dwumetyloformamidzie.

Przykład III. Ester 2, 4, 5-trójchlorofenylowy N-karbobenzoksy-(guanido)- N-tozyl- L-arginyny (CBO/Tos/Arg-OCP).

113 g N-karbobenzoksy- (guanido)-tozyl- L-argininy i 65 g 2, 4, 5-trójchlorofenolu rozpuszcza się w 800 ml octanu etylowego i dodaje w temperaturze -10°C 51 g dwucykloheksylokarbodwuimidu. Wytrząsa się w ciągu 1 godziny i przesącza. Po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość wytrąca się ponownie za pomocą mieszaniny benzenu i eteru. Otrzymuje się 124 g estru 2, 4, 5-trójchlorofenylowego N-karbobenzoksy-(guanido)-tozyl- L-argininy.

Przykład IV. Ester 2, 4, 5-trójchlorofenylowy N-karbobenzoksy- L-fenylalaniny (CBO-Fen-OCP).

90 g N-karbobenzoksy- L-fenylalaniny i 80 g 2, 4, 5-trójchlorofenolu rozpuszcza się w 100 ml octanu etylowego i dodaje się w temperaturze -10°C 62 g dwucykloheksylokarbodwuimidu. Po upływie 2 godzin odsącza się w temperaturze pokojowej dwucykloheksylomocznik i odparowuje do suchości. Po przekrystalizowaniu z etanolu otrzymuje się 120 g estru N-karbobenzoksy- L-fenylalaninylo-2, 4, 5-trójchlorofenylowego. Temperatura topnienia 142°C . (α) $\frac{21}{D}$ = -42° w dwumetyloformamidzie.

Przykład V. Ester 2, 4, 5-trójchlorofenylowy N-karbobenzoksy- γ -0-III-rzęd. butylo- L-glutamininy (CBO-Glu/OTB-OCP).

Do 40 g kwasu N-karbobenzoksy- γ -0-III-rzęd. butyl- L-glutaminowego i 35 g 2, 4, 5-trójchlorofenolu w 350 ml acetonitrylu w temperaturze -10°C dodaje się 28 g dwucykloheksylokarbodwuimidu. Wytrząsa się 2 godziny w temperaturze pokojowej, dodaje się 350 g octanu etylowego i odsącza się dwucykloheksylomocznik. Roztwór odparowuje się do suchości i pozostałość przekrystalizowuje z acetonitrylu. Otrzymuje się 55 g estru 2, 4, 5-trójchlorofenylowego kwasu N-karbobenzoksy- γ -0-III-rzęd. butylo- L-glutaminowego.

Temperatura topnienia 108°C (α) $\frac{21}{D}$ = -21° w dwumetyloformamidzie.

Przykład VI. Ester 2, 4, 5-trójchlorofenylowy N-karbobenzoksy-L-tryptofanyloglicyny (CBO-Try-Gly-OCP).

79 g N-karbobenzoksy- L-tryptofanyloglicyny i 50 g 2, 4, 5-trójchlorofenolu rozpuszcza się w

500 ml octanu etylu i dodaje 41 g dwucykloheksylokarbodwuimidu w temperaturze -10°C . Przesącza się i odparowuje do suchości. Po przekrystalizowaniu z metanolu otrzymuje się 100 g estru 2, 4, 5-tróchlorofenyłowego N-karbобензоксы- L-tryptofenyloglicyny. Temperatura topnienia 180°C (α) $\frac{21}{D} = -22^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Przykład VII. Ester 2, 4, 5-tróchlorofenyłowy N-karbобензоксы- L-waliloglicyny (CBO-Wal-Gli-OCP).

26 g N-karbобензоксы- L-waliloglicyny i 20 g 2, 4, 5-tróchlorofenolu rozpuszcza się w 150 ml chloroformu i dodaje w temperaturze -10°C 17 g dwucykloheksylokarbodwuimidu. Po dwugodzinnym wytrząsaniu odsącza się mocznik, rozpuszczalnik odparowuje się w próżni i pozostałość przekrystalizowuje z etanolu. Otrzymuje się 35 g estru 2, 4, 5-tróchlorofenyłowego/N-karbобензоксы- L-waliloglicyny. Temperatura topnienia 180°C (α) $\frac{21}{D} = 23^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Przykład VIII. Ester 2, 4, 5-tróchlorofenyłowy N-karbобензоксы- L-waliny (CBO-Wal-OCP).

50 g N-karbобензоксы- L-waliny rozpuszcza się w 300 ml acetonitrylu, dodaje 44 g 2, 4, 5-tróchlorofenolu i w temperaturze -10° dodaje 41 g dwucykloheksylokarbodwuimidu. Wytrząsa się w ciągu 2 godzin w temperaturze 20°C , odsącza dwucykloheksylomocznik i odparowuje w próżni. Po przekrystalizowaniu z mieszaniny eteru i eteru naftowego otrzymuje się 65 g estru 2, 4, 5-tróchlorofenyłowego N-karbобензоксы- L-waliny. Temperatura topnienia 93°C . (α) $\frac{21}{D} = -8^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Przykład IX. Amid- L-walilo-ε- N-formylo- L-lizylo- L-walilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny (H-Wal/For/Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂) porównaj fig. 1.

50 g amidu L-prolilo- L-waliny i 100 g estru tróchlorofenyłowego dwukarbобензоксы- L-tyrozyliny (przykład I) rozpuszcza się w 100 ml dwumetyloformamidu, pozostawia się na 48 godzin w temperaturze 20°C i przesącza. Do roztworu dodaje się 500 ml 1 n kwasu solnego i olejową pozostałość rozpuszcza się w octanie etylowym. Po przemyciu rozcieńczonym kwasem solnym i roztworem kwaśnego węglanu sodowego odparowuje się do suchości. Po przekrystalizowaniu z mieszaniny octanu etylowego i eteru otrzymuje się 100 g CBO-(CBO)Tyr-Pro-Wal-NH₂.

Do tego dodaje się 90 ml 2 n ługu sodowego i 200 ml etanolu. Pozostawia się w ciągu godziny w temperaturze pokojowej i dodaje się 1000 ml 1 n kwasu solnego. Pozostałość przemycia się najpierw wodą, a po wysuszeniu octanem etylu. Otrzymuje się 60 g CBO-Tyr-Pro-Wal-NH₂. Temperatura topnienia $218-220^{\circ}\text{C}$ (α) $\frac{21}{D} = -23^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 200 ml 4 n roztworu bromowodoru w kwasie octowym

i pozostawia się w ciągu jednej godziny w temperaturze 20°C . Po dodaniu mieszaniny eteru i octanu etylu wytrąca się H-Tyr-Pro-Wal-NH₂ w postaci bromowodorku. Wydajność 50 g.

42 g bromowodorku H-Tyr-Pro-Wal-NH₂ rozpuszcza się w 200 ml dwumetyloformamidu i dodaje 33 g CBO-Wal-OCP (przykład VIII) w 12 ml trójetiloaminy. Wytrząsa się w ciągu 48 godzin w temperaturze pokojowej i dodaje 500 ml 1 n kwasu solnego. Wytrącony produkt rozpuszcza się w octanie etylowym i przemycia rozcieńczonym kwasem solnym i roztworem kwaśnego węglanu sodowego. Z roztworu w octanie etylu wytrąca się eterem. Otrzymuje się 39 g CBO-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂. (α) $\frac{21}{D} = -26^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 200 ml 4 n bromowodoru w lodowatym kwasie octowym i pozostawia się w temperaturze 20°C . Po dodaniu mieszaniny eteru i octanu etylu wytrąca się 32 g H-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂ w postaci bromowodorku.

39 g bromowodorku H-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂, 29 g CBO-/For/Liz-OCP (przykład II) rozpuszcza się w 100 ml dwumetyloformamidu i dodaje się 7,5 ml trójetiloaminy. Wytrząsa się w ciągu 48 godzin w temperaturze 20°C dodaje 500 ml 1 n kwasu octowego i wytrącony produkt przemycia wodą a następnie octanem etylowym. Otrzymuje się 36 g CBO-/For/Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂. (α) $\frac{21}{D} = -24^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 200 ml 4 n roztworu bromowodoru w lodowatym kwasie octowym i pozostawia się w ciągu godziny w temperaturze 20°C . Po dodaniu mieszaniny eteru i octanu etylowego wydziela się 33 g bromowodorku H-(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂.

32 g bromowodorku H-(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂ i 21 g CBO-Wal-OCP rozpuszcza się w 50 ml dwumetyloformamidu i dodaje 8,7 ml trójetiloaminy. Wytrząsa się 48 godzin w temperaturze 20°C i dodaje 1000 ml 1 n kwasu octowego. Wytrącony produkt odsącza się i przemycia wodą oraz octanem etylowym. Otrzymuje się 30 g N-CBO-Wal-(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂ (α) $\frac{21}{D} = -34^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 500 ml metanolu i uwodarnia w ciągu 3 godzin, pod normalnym ciśnieniem w obecności katalizatora palladowego. Odsącza się, odparowuje w próżni, suszy w temperaturze 50° . Otrzymuje się 21 g H-Wal-(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂ (α) $\frac{21}{D} = -33^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Przykład X. E- N-Formylo- L-lizylo- E-N-formylo- L-lizylo (guanido) N-tozylo- L-arginylo- (guanido) N-tozylo- L-arginylo- L-prolina H(For)Liz(For)Liz(Tos)Arg-(Tos)Arg Pro-OH, 64 g CBO-(Tos)Arg-OCP (przykład III) i 19 g estru III rzęd. butylowego L-proliny (H-Pro-OTB) rozpuszcza się w 70 ml octanu etylu i pozostawia się na 16 godzin w temperaturze 20°C . Przemycia się rozcieńczonym ługiem sodowym, rozcieńczonym kwa-

sem fosforowym i nasyconym roztworem chlorku sodowego, suszy nad siarczanem sodowym i odparowuje w próżni. Po przekrystalizowaniu z mieszaniny benzenu i eteru otrzymuje się 49 g CBO-/TOS/Arg-Pro-OTB. Temperatura topnienia $127^{\circ}\text{C.} (\alpha) \frac{21}{D} = -29^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

116 g CBO-(Tos)Arg-Pro-OTB rozpuszcza się w 150 ml kwasu trójfluorooctowego i pozostawia na 2 godziny w temperaturze 20°C . Dodaje się eteru i wytrącony osad rozpuszcza się w 1 n amoniaku. Przemycia się octanem etylu, zakwasza 4 n kwasem siarkowym i osad rozpuszcza się w octanie etylu. Po wysuszeniu nad siarczanem sodowym odparowuje się w próżni. Otrzymuje się 98 g CBO-(Tos)Arg-Pro-OH. $(\alpha) \frac{21}{D} = -11^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 500 ml 4 n roztworu bromowodoru w kwasie octowym i pozostawia na godzinę w temperaturze 20°C . Po dodaniu eteru wydziela się 83 g bromowodoru H-(Tos)Arg-Pro-OH.

60 g bromowodoru H-(Tos)Arg-Pro-OH i 80 g CBO-(Tos)Arg-OCP (przykład III) rozpuszcza się w 200 ml dwumetyloformamidu i dodaje 52 ml trójetyloaminy. Wytrząsa się w ciągu 48 godzin w temperaturze 20°C , przesącza się i dodaje 500 ml 4 n kwasu octowego. Wydzielony olej rozpuszcza się w 1 n amoniaku, przemycia octanem etylu i zakwasza 4 n kwasem siarkowym. Wytrącony produkt ekstrahuje się mieszaniną octanu etylu i n-butanolu i ekstrakt odparowuje się w próżni. Otrzymuje się 86 g CBO-(Tos)Arg-/Pro-OH. $(\alpha) \frac{21}{D} = -40^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 500 ml 4 n roztworu bromowodoru w lodowatym kwasie octowym i pozostawia w ciągu godziny w temperaturze 20° . Po dodaniu eteru wydziela się 86 g bromowodoru H-Tos(Arg-(Tos)-Arg-Pro-OH.

61 g bromowodoru H-(Tos)Arg-(Tos)-Arg-Pro-OH i 32 g CBO-(For) Liz-OCP (przykład II) rozpuszcza się w 200 ml dwumetyloformamidu i dodaje 90 ml trójetyloaminy. Całość wytrząsa się w ciągu 48 godzin w temperaturze 20°C , przesącza i dodaje 500 ml 4 n kwasu octowego. Wytrącony produkt rozpuszcza się w 1 n amoniaku, przemycia octanem etylu i zakwasza się 4 n kwasem siarkowym. Wydzielony olej ekstrahuje się mieszaniną octanu etylu i n-butanolu a ekstrakt suszy nad siarczanem sodowym i odparowuje w próżni. Otrzymuje się 42 g CBO-(For) (Liz-(Tos)Arg-Tos(Arg)-Pro-OH. $(\alpha) \frac{21}{D} = -23^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 300 ml 4 n roztworu bromowodoru w lodowatym kwasie octowym i pozostawia się w ciągu godziny w temperaturze 20°C . Po dodaniu eteru wydziela się 39 g bromowodoru H-(For)Liz-(Tos)Arg(Tos)Arg-Pro-OH.

37 g bromowodoru H-(For)Liz(Tos)Arg-Pro-OH i 19 g CBO-(For)Liz-OCP (przykład II) rozpuszcza się w 100 ml dwumetyloformamidu i dodaje 68 ml trójetyloaminy. Wytrząsa się w ciągu 48

godzin w temperaturze 20°C i dodaje 500 ml 4 n kwasu octowego. Wydzielony olej rozpuszcza się w 1 n amoniaku i przemycia octanem etylu. Następnie zakwasza się rozcieńczonym kwasem siarkowym i ekstrahuje mieszaniną n-butanolu i octanu etylu. Po wysuszeniu nad siarczanem sodowym i odparowaniu w próżni otrzymuje się 28 g CBO-(For)Liz-(For)Liz(Tos)Arg(Tos)Arg-Pro-OH. $(\alpha) \frac{21}{D} = -18^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 500 ml 4 n roztworu bromowodoru w lodowatym kwasie octowym i pozostawia się w ciągu 1 godziny w temperaturze 20°C . Po dodaniu eteru wydziela się 31 g bromowodoru H-(For)-Liz-(For)Liz-(Tos) (Arg-)Tos(Arg)Pro-OH.

Przykład XI. Amid L-walilo-glicylo- ϵ -N-formylo-L-lizylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- (guanido) N-tozylo- L-arginylo- (guanido) N-tozylo- L-arginylo- L-prolilo- L-walilo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-walilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny. H-Wal-Gli-(For)Liz(For)Liz(Tos)Arg (Tos) Arg-Pro-Wal(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂ (porównaj fig. 3).

17 g CBO-Wal-Gli-OCP (przykład VII) i 40 g bromowodoru H-(For)Liz-(For)Liz(Tos)Arg-(Tos) Arg-Pro-OH (przykład X) rozpuszcza się w 100 ml dwumetyloformamidu i dodaje się 100 ml trójetyloaminy. Wytrząsa się w ciągu 48 godzin w temperaturze 20°C , odsącza i dodaje 500 ml 4 n kwasu octowego. Wydzielony olej rozpuszcza się w rozcieńczonym roztworze amoniaku i przemycia octanem etylowym. Po zakwaszeniu 4 n kwasem siarkowym ekstrahuje się mieszaniną n-butanolu i octanu etylu, suszy nad siarczanem sodowym i odparowuje do suchości.

Otrzymuje się 26 g CBO-Wal-Gli-(For)Liz-(For) Liz-(Tos)Arg-(Tos)Arg-Pro-OH. $(\alpha) \frac{21}{D} = -16^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt jak również 19 g H-Wal-(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂ (przykład IX) rozpuszcza się w 160 ml formamidu i dodaje w temperaturze -10°C 7,2 g dwucykloheksylokarbodwuimidu. Wytrząsa się w ciągu 16 godzin w temperaturze 20°C i odsącza się dwucykloheksylomocznik. Do roztworu dodaje się rozcieńczonego kwasu solnego i wytrącony produkt przemycia wodą i octanem etylowym. Następnie rozpuszcza się w gorącym etanolu i po oziębieniu produkt odsącza się. Otrzymuje się 22 g CBO-Wal-Gli-(For)Liz-(For)Liz(Tos)Arg-(Tos)Arg- Pro- Wal- (For)Liz- Wal-Tyr- Pro-Wal-NH₂. $(\alpha) \frac{21}{D} = -29^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 400 ml 4 n roztworu bromowodoru w lodowatym kwasie octowym i pozostawia się w ciągu godziny w temperaturze 20°C . Po dodaniu eteru wydziela się 20 g bromowodoru H-Wal-Gli-(For)Liz(For) Liz-(Tos)Arg- (Tos)-Arg- Pro- Wal- (For)Liz-Wal-Tyr-Pro- Wal-NH₂.

Przykład XII. Ester III-rzęd. butylowy (guanido) -N-tozylo- L-arginylo- L-tryptofanylo-

-glicylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-proliny (H-(Tos)Arg-Try-Gly-(For)Liz-Pro-OTB (porównaj fig. 4).

97,4 g CBO-(For)Liz-OCP (przykład II) i 40 g estru III-rzęd. butylowego L-proliny (H-Pro-OTB) rozpuszcza się w 200 ml dwumetyloformamidu, pozostawia się na 16 godzin, dodaje się 500 ml octanu etylu, otrzymany roztwór przemawia się rozcieńczonym kwasem fosforowym i roztworem kwaśnego węgla potasowego. Po wysuszeniu siarczanem sodowym roztwór odparowuje się i otrzymaną oleistą pozostałość przemawia się eterem naftowym, po czym rozpuszcza się w 600 ml etanolu i 12 ml lodowatego kwasu octowego i odszczepia grupę CBO przez uwodornienie pod normalnym ciśnieniem w obecności katalizatora palladowego. Katalizator odsącza się i odparowuje metanol. Po wysuszeniu w wysokiej próżni otrzymuje się 77 g kwasu H-(For)Liz-Pro-OTB-octowego w postaci lepkiego oleju. Ten rozpuszcza się w 200 ml dwumetyloformamidu, dodaje się 96 g CBO-Try-Gli-OCP i 30 ml trójetyloaminy i ogrzewa się w ciągu 6 godzin w temperaturze 50°C. Po dodaniu 1000 ml octanu etylowego i przemyciu rozcieńczonym kwasem fosforowym i roztworem kwaśnego węgla potasowego roztwór suszy się nad siarczanem sodowym i odparowuje. Pozostałość przemawia się eterem i suszy. Otrzymuje się 110 g CBO-Try-Gli-(For)Liz-Pro-OTB. Temperatura topnienia 105–112°C. $(\alpha)_D^{21} = 53^\circ$ w dwumetyloformamidzie

106 g CBO-Try-Gli-/For/Liz-Pro-OTB i 9 ml lodowatego kwasu octowego rozpuszcza się w 1000 ml metanolu i uwodarnia się w obecności katalizatora palladowego w celu odszczepienia grupy CBO.

Katalizator odsącza się, odparowuje rozpuszczalnik i pozostałość suszy w wysokiej próżni. Rozpuszcza się ją w 150 ml dwumetyloformamidu, dodaje 105 g CBO-(Tos)Arg-OCP i 22 ml trójetyloaminy i miesza się w ciągu 16 godzin w temperaturze 20°C i 6 godzin w temperaturze 50°C. Dodaje się 1500 ml octanu etylu, przemawia rozcieńczonym kwasem siarkowym, roztworem węgla sodowego i wodą. Suszy nad siarczanem sodowym, zagęszcza roztwór i wytrąca produkt po dodaniu eteru. Po przesączeniu i wysuszeniu otrzymuje się 108 g CBO-(Tos)Arg-Try-Gli-(For)/Liz-Pro-OTB. Temperatura topnienia 102°C (z rozkładem) $(\alpha)_D^{21} = -29^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 1600 ml metanolu i uwadarnia się w obecności katalizatora palladowego pod normalnym ciśnieniem, w celu całkowitego odszczepienia grupy CBO. Odsącza się katalizator i suszy w temperaturze 60°C w wysokiej próżni. Otrzymuje się 64 g H-/Tos/Arg-Try-Gli/For/Liz-Pro-OTB. $(\alpha)_D^{21} = -34^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Przykład XIII. Amid L-glutamyl- L-histydyl- L-fenyl- alanylo- L-arginylo- L-tryptofanilo- glicylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-prolilo-

L-waliloglicylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-arginylo- L-arginylo- L-prolilo- L-walilo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-walilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny.

5 H-Glu-His-Fen-Arg-Try-Gli-(For) Liz-Pro-Wal-Gli-(For) Liz (For)Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂ (porównaj fig. 5).

57 g H-(Tos)Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-OTB i 42 g CBO-Fen-OCP (przykład IV) rozpuszcza się w 100 ml dwumetyloformamidu pozostawia się na 16 godzin w temperaturze pokojowej, dodaje 2000 ml octanu etylu, przemawia rozcieńczonym kwasem siarkowym i roztworem węgla sodowego, suszy nad siarczanem sodowym, odparowuje i przemawia pozostałość eterem.

Po wysuszeniu w wysokiej próżni otrzymuje się 85 g CBO-Fen-(Tos)Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-OTB.

Temperatura topnienia 180°C (z rozkładem)

$(\alpha)_D^{21} = -32^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany wyżej produkt rozpuszcza się w 1600 ml metanolu i uwodarnia się w obecności katalizatora palladowego pod normalnym ciśnieniem w celu całkowitego odszczepienia grupy CBO. Po przesączeniu roztwór zagęszcza się i produkt wytrąca eterem. Po wysuszeniu w wysokiej próżni w temperaturze 60°C otrzymuje się 57 g H-Fen-(Tos) Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-OTB.

$(\alpha)_D^{21} = -48^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

54 g H-Fen-(Tos)Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-OTB i 20 g CBO-His-N₃ rozpuszcza się w mieszaninie 60 ml octanu etylowego i 60 ml dwumetyloformamidu i pozostawia się na 48 godzin w temperaturze 0°C.

Odparowuje się, pozostałość traktuje się 500 ml octanu etylowego, przesącza i suszy stały produkt w wysokiej próżni. Otrzymuje się 74 g CBO-His-Fen-(Tos) Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-OTB.

Temperatura topnienia 160–180°C. $(\alpha)_D^{21} = -41^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 740 ml kwasu trójfluorooctowego i przechowuje się w ciągu 1 godziny w temperaturze 20°C. Odparowuje się i przemawia pozostałość eterem, rozpuszcza w mieszaninie dioksan/woda (4:1) i przesącza się przez kolumnę z zasadowym wymieniaczem jonowym aby usunąć ostatnie ślady kwasu trójfluorooctowego. Przesącz odparowuje się w próżni.

Otrzymuje się 62 CBO-His-Fen-(Tos)Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-OH. Otrzymany produkt rozpuszcza się w 1500 ml metanolu i uwadarnia się w obecności katalizatora palladowego pod normalnym ciśnieniem, aż do całkowitego odszczepienia grupy CBO. Przesącza się, przemawia katalizator 100 ml dwumetyloformamidu, połączone przesącze zagęszcza się i wytrąca się heptapeptyd za pomocą eteru. Po wysuszeniu otrzymuje się 40 g H-His-Fen-(Tos)Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-OH. Temperatura topnienia 220–225°C.

$(\alpha)_D^{21} = -34^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 300 ml

dwumetyloformamidu, dodaje 28,5 g CBO-Glu(OTB)-OCP, pozostawia się na 3 dni w temperaturze 20°, zagęszcza się i dodaje 1000 ml eteru. Po przesączeniu osad przemywa się octanem etylu, rozpuszcza się w mieszaninie dioksanu i wody (4:1) przesącza i odparowuje.

Pozostałość rozpuszcza się w małej ilości dwumetyloformamidu i wytrąca octanem etylu. Po przesączeniu i w wysuszeniu w wysokiej próżni otrzymuje się 39 g CBO-Glu(OTB)-His-Fen-(Tos) Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-OH. Temperatura topnienia 175–180°. (α) $\frac{21}{D} = -31^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 60 ml pirydyny i dodaje się 30 g trój (2, 4, 5-trójchlorofenilo) fosforynu, który wytwarza się następująco:

Sporządza się mieszaninę 88 g 2, 4, 5-trójchlorofenolanu sodowego w 500 ml benzenu i dodaje się 12 ml trójchlorku fosforu w temperaturze 0°C. Po 3 godzinach w temperaturze 80°C odsącza się chlorek sodowy i roztwór odparowuje. Po przekrystalizowaniu z octanu etylu otrzymuje się 52 g trój (2, 4, 5-trójchlorofenilo) fosforynu o temperaturze topnienia 122°C, który pozostawia się na 16 godzin w temperaturze 20°C, dodaje eteru, przesącza, przemywa gorącym octanem etylu i suszy.

Otrzymuje się 42 g CBO-Glu(OTB)-His-Fen-(Tos)Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-OCP (α) $\frac{21}{D} = -26,1^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

19 g CBO-Glu(OTB)-His-Fen-(Tos)Arg-Gli-(For)Liz-Pro-OCP i 20 g H-Wal-Gli-(For)Liz-(For)Liz-(Tos)Arg-(Tos) Arg Pro-Wal(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂ rozpuszcza się w 40 ml dwumetyloformamidu i 2 ml trójetyloaminy i ogrzewa się otrzymany roztwór w ciągu 18 godzin w temperaturze 50°C. Dodaje się 1000 ml wrzącego acetonu i przemywa się jeszcze starannie wytrącony produkt acetonem i suszy w próżni. Rozpuszcza się go w mieszaninie dioksanu i wody (4:1) przesącza przez kwaśny wymiennicz jonowy i odparowuje do suchości. Pozostałość przemywa się octanem etylu i suszy w próżni.

Otrzymuje się 27 g CBO-Glu(OTB)-His-Fen-(Tos)Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-Wal-Gli-(For)Liz-(For)Liz (Tos) Arg-(Tos) Arg-Pro-Wal-(For)-Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂.

Temperatura topnienia 210–220°C. (α) $\frac{21}{D} = -38^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

5 g otrzymanego, chronionego henekozapeptydu rozpuszcza się w 7,5 litra suchego amoniaku i dodaje przy silnym mieszaniu kawałki sodu aż do uzyskania trwałego, ciemno-niebieskiego zabarwienia.

Następnie dodaje się 2 g chlorku amonu, odparowuje amoniak, suszy pozostałość w wysokiej próżni i rozpuszcza się ją w 250 ml 0,2 n octanu etylu. Po odsoleniu roztworu odparowuje się do suchości, pozostałość przemywa etanolem i suszy w próżni.

Otrzymuje się 4,4 g H-Glu-His-Fen-Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-Wal-Gli (For)Liz-(For)Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂.

Przykład XIV. Amid N-trytylo- L-serylo- L-tyrozylo- L-serylo- L-norleucylo- L-glutamyl- L-histydylo- L-fenylalanilo- L-arginylo- L-tryptofanyloglicylo- ϵ -N-formylo-lizylo- L-prolilo- L-walloglicylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-arginylo- L-arginylo- L-prolilo- L-walilo- ϵ -N-formylo- L-lizylo- L-walilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny.

(Tri - Ser - Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Fen-Arg-Try-Gli-(For)Liz-Pro-Wal-Gli-(For) - Liz (For)-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal - (For)Liz - Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂) (porównaj fig. 6).

174 g Tri-Ser-OH i 117 g H-Tyr-OMe rozpuszcza się w mieszaninie 2 litrów acetonitrylu, 1 litra chloroformu i 50 ml dwumetyloformamidu, oziębia się do temperatury -10°, dodaje się 124 g dwucykloheksylokarbodwuimidu i miesza się w ciągu 5 godzin w temperaturze 20°C. Przesącza, przemywa 1,5 litra pirydyny, połączone przesącza odparowuje do suchości i pozostałość krystalizuje z gorącego octanu etylu. Otrzymuje się 221 g Tri-Ser-Tyr-OMe. Temperatura topnienia 232°C.

(α) $\frac{21}{D} = -34^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 500 ml dwumetyloformamidu i dodaje się 100 ml hydrazyny. Po 24 godzinach w temperaturze 20°C przelewa się roztwór do 5 litrów octanu etylu, odwirowuje, oleistą pozostałość rozpuszcza się w 2 litrach octanu etylu i roztwór przemywa się wodą aż do zobojętnienia. Suszy siarczanem sodowym, odparowuje do suchości i pozostałość przemywa eterem.

Otrzymuje się 182 g Tri-Ser-Tyr-NHNH₂. Temperatura topnienia 120°C (z rozkładem) (α) $\frac{21}{D} = -30^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

131 g CBO-Ser-OH i 95 g H-Nle-OMe w postaci chlorowodoru rozpuszcza się w 2 litrach chloroformu i 70 ml trójetyloaminy, oziębia się do temperatury -10°C, dodaje się 124 g dwucykloheksylokarbodwuimidu i miesza w ciągu 5 godzin w temperaturze 20°C.

Przesącza, przesącza odparowuje, pozostałość przemywa eterem naftowym, wodą i suszy. Podaje się krystalizacji z mieszaniny octanu etylu i eteru naftowego i otrzymuje się 151 g CBO-Ser-Nle-OMe. Temperatura topnienia 71°C.

(α) $\frac{21}{D} = -19^\circ$ w metanolu.

Grupę CBO odszczepia się przez katalityczne uwodornienie w metanolu w obecności katalizatora palladowego i równoważnej ilości chlorowodoru. Po oddzieleniu katalizatora, odparowaniu i dodaniu eteru etylowego otrzymuje się z ilościową wydajnością chlorowodorek H-Ser-Nle-OMe.

46 g Tri-Ser-Tyr-NHNH₂ rozpuszcza się w mieszaninie 120 ml dwumetyloformamidu, 120 ml izopropanolu i 120 ml wody, oziębia się do temperatury -10°C dodaje 44 ml 6 n kwasu solnego i przy silnym mieszaniu dodaje się 3,5 g azotynu sodowego. Po upływie 5 minut dodaje się 250 ml 1 n węglanu potasowego i 1500 ml wody. Odsącza się, stały produkt rozpuszcza się w 200 ml

dwumetyloformamidu, dodaje 24 g chlorowodoru N-Ser-Nle-OMe i 23 ml trójetylu aminy i pozostawia się na 16 godzin w temperaturze 20°C.

Roztwór przelewa się do 1000 ml wody, ekstrahuje octanem etylu, suszy siarczanem sodowym i odparowuje. Po przemyciu pozostałości eterem otrzymuje się 56,5 g Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-OMe.

Temperatura topnienia 130–140° (z rozkładem).

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 200 ml gorącego etanolu, dodaje się 3 ml hydrazyny, pozostawia się na 24 godziny w temperaturze 20°C, dodaje się 200 ml eteru, przesącza, przemycia eterem i suszy w próżni nad pięciotlenkiem fosforu i stężonym kwasem siarkowym. Otrzymuje się 51 g Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-NH-NH₂. Temperatura topnienia 205°C.

8,8 g Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-NH-NH₂ rozpuszcza się w 30 ml dwumetyloformamidu, dodaje się 10 ml wody, oziębia do temperatury -10°C, dodaje 5 ml 6 n kwasu solnego oraz 750 g siarczynu sodowego, miesza się w ciągu 5 minut w temperaturze -5°C, dodaje się 300 ml 0,2 n roztworu węglanu sodowego i odwirowuje.

Otrzymany Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-N₃ rozpuszcza się w 50 ml dwumetyloformamidu, dodaje 20 g H-Glu-His-Fen-Arg-Try-Gli(For)Liz-Pro-Wal-Gli(For)-Liz(For)-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂ i 5 ml wody i traktuje się trójetylaminą aż do reakcji alkalicznej. Pozostawia się na 12 godzin w temperaturze 0°C, dodaje się jeszcze dalszą ilość azydku czteropeptydu otrzymaną z 4,8 g Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-NH-NH₂, pozostawia się na 6 godzin w temperaturze 20°C, odparowuje w wysokiej próżni, przemycia gorącym octanem etylu i chlorkiem metylenu i suszy w próżni. Otrzymuje się 23 g Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Fen-Arg-Try-Gli(For)Liz-Pro-Wal-Gli(For)Liz(For)Liz-Arg-Arg-Pro-Wal(For)Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂.

Przykład XV. Amid L-serylo- L-tyrozylo- L-serylo- L-norleucylo- L-glutamyl- L-histydyl- L-fenylalanylo- L-arginylo- L-tryptofanyloglicylo- L-lizylo- L-prolilo- L-waliloglicylo- L-lizylo- L-lizylo- L-arginylo- L-arginylo- L-prolilo- L-walilo- L-lizylo- L-walilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny

H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Fen-Arg-Try - Gly-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-Wal-Tyr-Pro-Wal-NH₂.

a) 10 g chronionego pentakozapeptydu ogrzewa się, mieszając bez dostępu tlenu w 5000 ml 0,1 n kwasu solnego w ciągu 3 godzin w temperaturze 100°C, odparowuje się w próżni, pozostałość przemycia acetonem i eterem etylowym i suszy w próżni. Po przeciwnym rozdzielaniu w mieszaninie kwasu trójfluorooctowego, II rzędu, butanolu i wody (1 ÷ 120 : 160) otrzymuje się 7,4 g głównej frakcji, która posiada takie same właściwości jak kortikotropina i która w chromatografii i elektroforezie zachowuje się jednolodnie.

Migracja w elektroforezie bibułowej przy pH 5,8 i napięciu 40 V/cm wynosi 56 mm w ciągu 60 minut (stosowana jako wzorzec histydyna przesuwana się 61 mm). Migracja w elektroforezie

bibułowej przy pH 1,9 i napięciu 40 V/cm wynosi 121 mm w ciągu 60 minut (stosowany jako wzorzec kwas glutaminowy przesuwany się 97 mm w tych samych warunkach).

Rf w chromatografii bibułowej w układzie n-butanol (kwas octowy) woda 70(10)20 wynosi 0,01 całkowita hydroliza daje następujący skład aminokwasów: Ser_{1,8}, Try_{1,9}, Nle_{1,0}, Glu_{0,9}, H Fen₁, Arg_{3,2}, Gli_{2,0}, Liz_{4,1}, Pro_{2,9}, Wal_{4,0} (Tyrozyna jak wiadomo ulega rozkładowi przy całkowitej hydrolizie kwasowej). Produkt może być stosowany sam lub po przekształceniu w inną sól.

Przechowuje się go w stanie stałym, roztworze lub w postaci adsorbentu.

b) 10 g chronionego pentakozapeptydu rozpuszcza się w mieszaninie 500 ml lodowatego kwasu octowego i 500 ml wody, ogrzewa w ciągu 10 minut w temperaturze 100°C, odparowuje, rozpuszcza w 5000 ml 0,01 n kwasu solnego, ogrzewa w ciągu 3 godzin w temperaturze 100°C i postępuje się dalej jak w punkcie a).

c) 10 g chronionego pentakozapeptydu rozpuszcza się w 1200 ml kwasu trójfluorooctowego, pozostawia się na 30 minut w temperaturze 20°C, odparowuje, rozpuszcza w 5000 ml 0,2 n kwasu solnego, ogrzewa w ciągu 90 minut w temperaturze 100°C i postępuje się dalej jak w punkcie a).

d) 10 g chronionego pentakozapeptydu rozpuszcza się w 4500 ml 0,5 n metanolowego roztworu kwasu solnego, pozostawia się mieszając na 24 godziny w temperaturze 20°C, odparowuje, rozpuszcza w 1000 ml 0,1 n kwasu solnego, ogrzewa w ciągu 1 godziny w temperaturze 100°C i postępuje dalej jak w punkcie a).

Zastrzeżenia patentowe

Sposób wytwarzania nowego polipeptydu o wzorze amidu L-serylo- L-tyrozylo- L-serylo- L-norleucylo- L-glutamyl- L-histydyl- L-fenylalanylo- L-arginylo- L-tryptofanyloglicylo- L-lizylo- L-prolilo- L-waliloglicylo- L-lizylo- L-lizylo- L-arginylo- L-arginylo- L-prolilo- L-walilo- L-lizylo- L-walilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny, **znamienny tym**, że pochodną polipeptydu o wzorze amidu N-A-L-serylo- L-tyrozylo- L-serylo- L-norleucylo- L-glutamyl- L-histydyl- L-fenylalanylo- L-arginylo- L-tryptofanylo- L-glicylo- ε-N-formylo- L-lizylo- L-prolilo- L-L-walilo-glicylo- ε-N-formylo- L-lizylo- ε-N-formylo- L-lizylo- L-arginylo- L-arginylo- L-prolilo- L-walilo- ε-N-formylo- L-lizylo- L-walilo- L-tyrozylo- L-prolilo- L-waliny, w którym A oznacza grupę nadającą się do ochrony grupy aminowej, zwłaszcza grupę karbobenzoksylową odszczepialną przez uwodornienie, przez traktowanie bromowodorem w kwasie trójfluorooctowym lub przez traktowanie metalem alkalicznym w cieklej amoniaku, albo przez hydrolizę kwaśną, grupę karboalkiloksylową, odszczepialną przez kwaśną hydrolizę, grupę trójfluoroacetylową odszczepialną przez zmydlenie lub traktowanie hydrazyną, grupę acetylową, chloroacetylową lub for-

mylową odszczepialną przez kwaśną hydrolizę, grupę karbo III rząd. butoksylową lub p-nitro-karbo-benzoksylową odszczepialną przez kwaśną hydrolizę, przez traktowanie bromowodorem w kwasie trójfluoro-octowym lub przez traktowanie kwasem trójfluorooctowym, lub grupę trójfenylometylową i formylową odszczepialną za pomocą bromowodoru w kwasie trójfluorooctowym za pomocą kwasu trójfluorooctowego na drodze kwaśnej hydro-

lize lub przez traktowanie metalem alkalicznym w cieklym amoniaku, lub grupę formylową odszczepialną przez kwaśną hydrolizę, traktuje się czynnikami odszczepiającymi odpowiednie grupy 5 ochronne, przy czym proces ten prowadzi się w jednym lub ewentualnie kilku stopniach, a tak otrzymany polipeptyd ewentualnie przeprowadza się w sól z nieorganicznymi lub organicznymi kwasami.

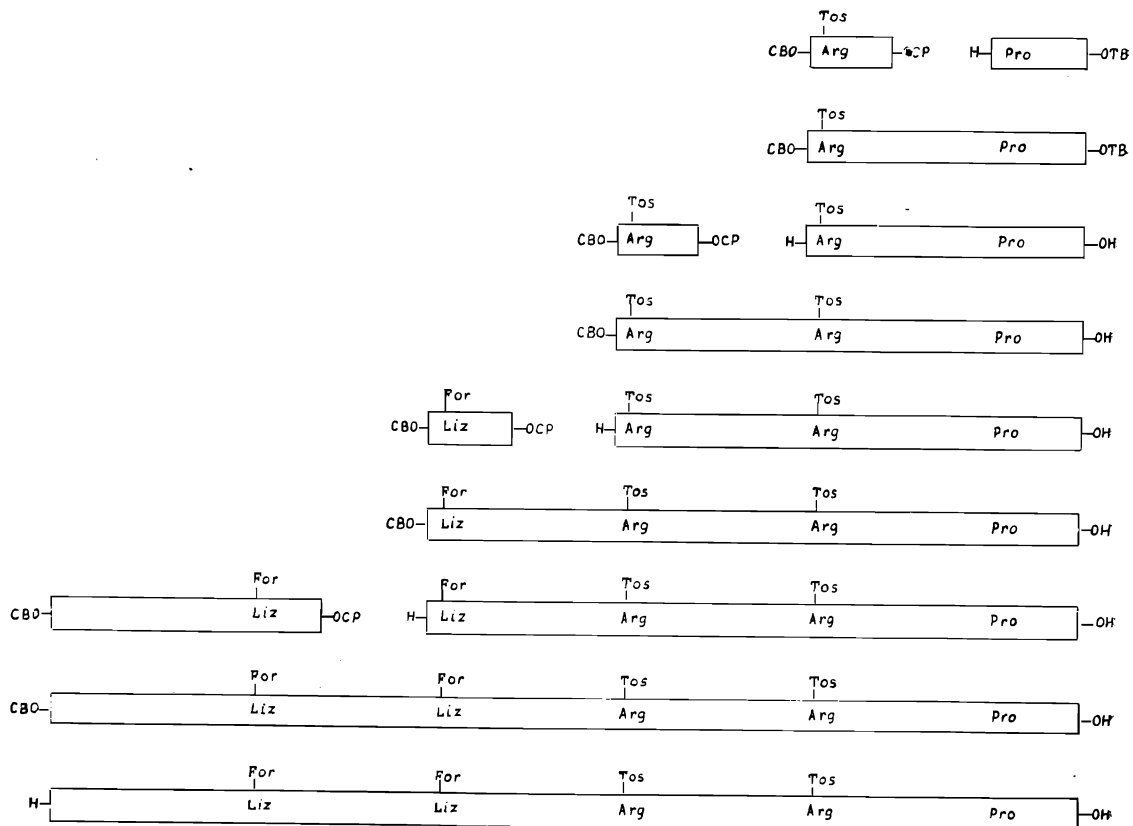
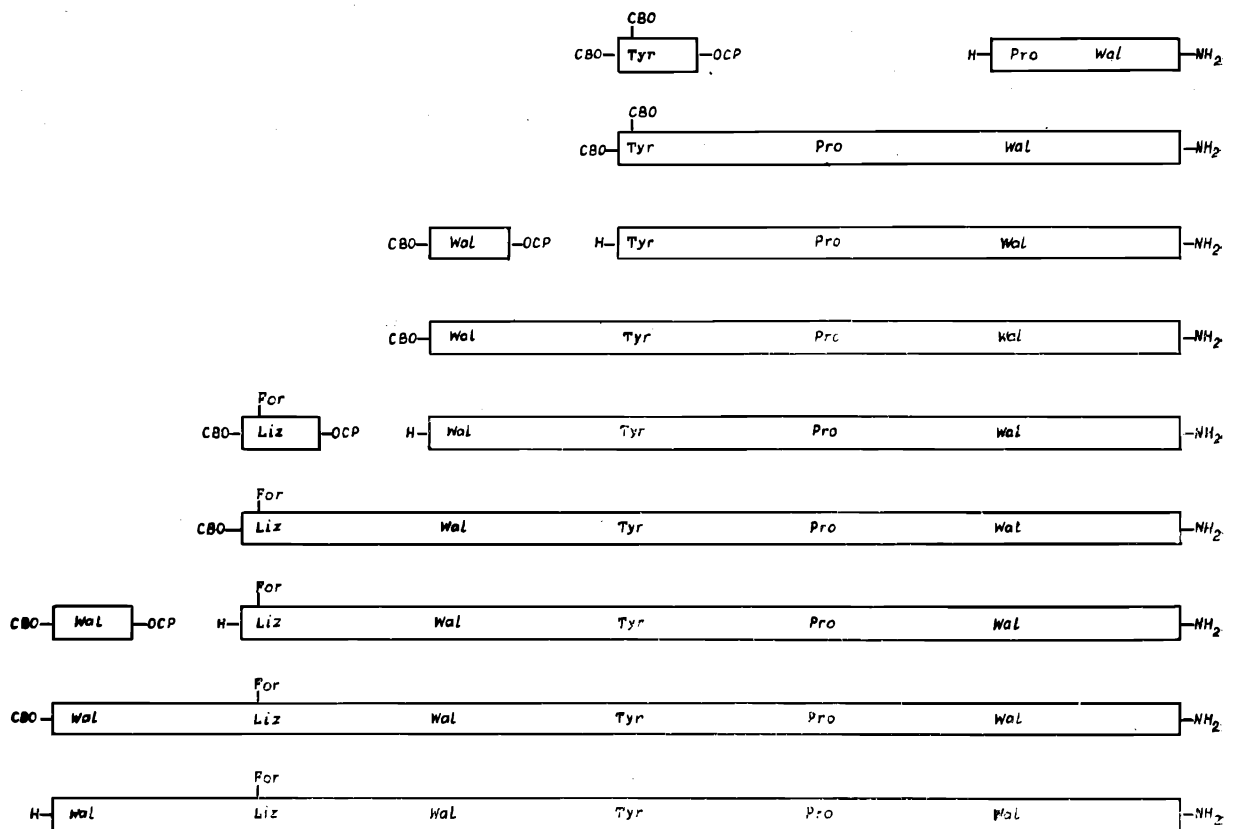


Fig-3

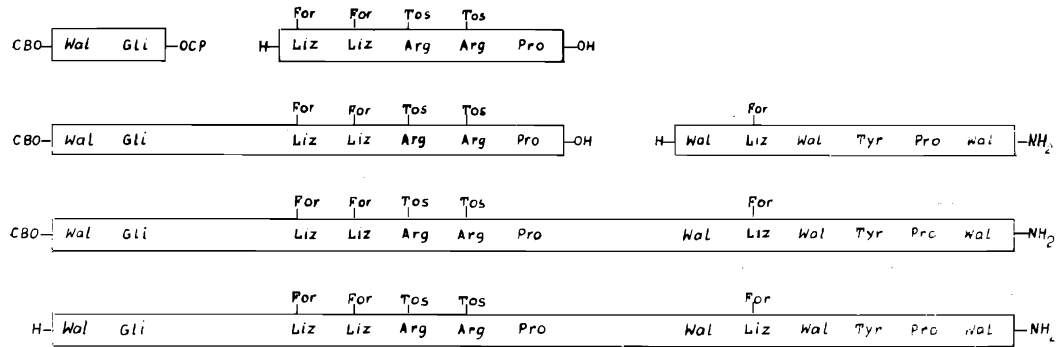
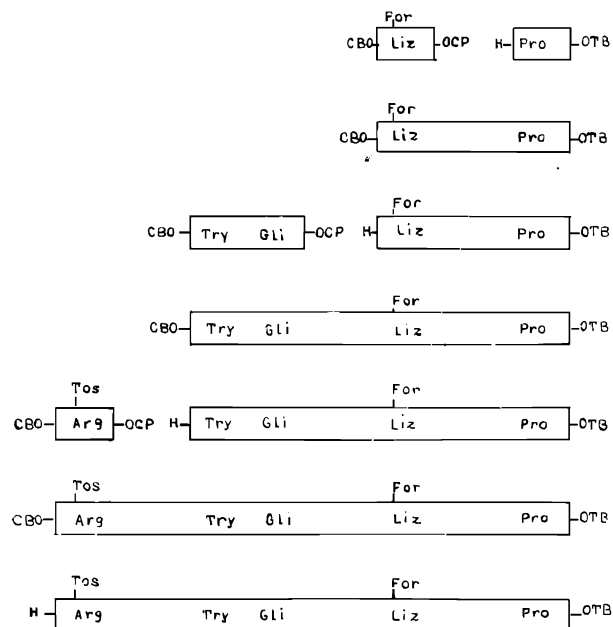


Fig-4



[illegible]

CBO- Ser Nle -OMe
 Tri- Ser Tyr -N₃ H- Ser Nle -OMe
 Tri- Ser Tyr Ser Nle -OMe
 Tri- Ser Tyr Ser Nle -HNH₂
 Tri- Ser Tyr Ser Nle -N₃ H- Glu His Fen Arg Try Gli Liz Pro Wal Gli Liz Liz Arg Arg Pro Wal Liz Wal Tyr Pro Wal -NH₂
 Tri- Ser Tyr Ser Nle Glu His Fen Arg Try Gli Liz Pro Wal Gli Liz Liz Arg Arg Pro Wal Liz Wal Tyr Pro Wal -NH₂
 H- Ser Tyr Ser Nle Glu His Fen Arg Try Gli Liz Pro Wal Gli Liz Liz Arg Arg Pro Wal Liz Wal Tyr Pro Wal -NH₂