



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

207570

(11)

(B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 C 103/52

(22) Přihlášeno 03 06 76

(21) (PV 3695-76)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 04 06 75
(583947), od 08 07 75 (594159) a
od 08 07 75 (594158)
Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 15 03 84

(72)

Autor vynálezu

ABRAHAM NEDUMPARAMBIL A., DOLLARD DES ORMEAUX, IMMER HANS
UELI, MOUNT ROYAL, NELSON VERNER ROBERT, KIRKLAND a SESTANJ
KAZIMIR, POINTE CLAIRE (Kanada)

(73)

Majitel patentu

AYERST, MCKENNA & HARRISON LIMITED, ST. LAURENT (Kanada)

(54) Způsob výroby tetradeka-peptidu

1

Vynález se týká derivátů tetradeka-peptidu somatostatinu. Přesněji se týká způsobu přípravy derivátů somatostatinu a jejich solí.

Název „somatostatin“ byl navržen pro faktor nalezený v hypothalamických ex-

2

traktech, který inhibuje sekreci růstového hormonu (somatotropin). Struktura tohoto faktoru byla stanovena v práci P. Brazeau a j. Science **179**, 77 (1973) a bylo nalezeno, že má následující strukturu tetradeka-peptidu vzorce

H—Ala—Gly—Cys—Lys—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys—Thr—Phe—Thr—Ser—Cys—OH

Zkratky zde použité pro různé aminokyseliny mají následující významy: Ala, alanin; Asn, asparagin; Cys, cystein; Gly, glycin; Lys, Lysin; Phe, fenylalanin; Ser, serin; Thr, threonin a Trp, tryptofan.

Struktura tetradeka-peptidu somatostatinu byla potvrzena syntézou, např. viz D. Sarantakis a W. A. McKinley, Biochem. Biophys. Res. Comm., **54** 234 (1973), J. Rivier a j., Compt. Rend. Ser. D, 276, 2737 (1973) a H. U. Immer aj., Helv. Chim. Acta, **57**, 730 (1974).

Důležitý fyziologický účinek tohoto tetradeka-peptidu jej zařazuje mezi sloučeniny vhodné pro klinickou farmakologii při léčení akromegalie a k použití při cukrovce, viz. K. Lundbaek aj., Lancet, **2**, 131 (1970) a R. Guillemin v „Chemistry and Biology of Peptides“, J. Meinhofer, Ed., 3rd American Peptide Symposium Boston 1972, Ann

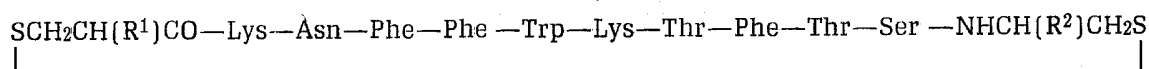
Arbor Science Publications, Ann Arbor, Mich., 1972.

Lineární forma somatostatinu s dvěma thiolovými skupinami místo disulfidového můstku byla připravena a je popsána v práci J. E. F. Rivier, J. Amer. Chem. Soc., **96**, 2986 (1974). Je popsáno, že lineární forma je stejně účinná jako somatostatin, účinnost byla stanovena podle schopnosti obou sloučenin inhibovat rychlost sekrece růstového hormonu slizovými buňkami krys pěstovaných v jednovrstvé tkáňové kultuře.

Nedávno byl nalezen polypeptid jiný než přírodní hormon a jeho lineární forma má aktivitu obdobnou somatostatinu. D. Sarantakis aj., Biochem. Biophys. Res. Comm., **55**, 538 (1973) nedávno uvedli syntézu analogu somatostatinu [Ala³⁻¹⁴] somatostatinu v pevné fázi. Tento analog má velmi nízkou ak-

tivitu, asi 0,01 % somatostatinu. P. Brazeau aj., Biochem. Biophys. Res. Comm., **60**, 1202 (1974) nedávno uvedli syntézu řady acylovaných derivátů des-[Ala¹-Gly²] metodou v pevné fázi.

Vynález uvádí deriváty somatostatinu, které mají účinek vyšší než přírodní hormon nebo stejného řádu a jejich účinek je větší než účinek somatostatinu. Tyto deriváty se připravují snadno běžným způsobem, který má následující výhody: vychá-



(I)

kde

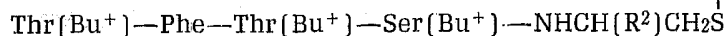
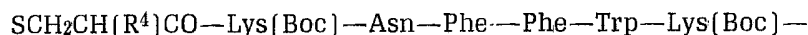
a) R^1 je $\text{H}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$, $\text{H}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ nebo $\text{H}-\text{Leu}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ a R^2 je H nebo COOH , nebo

b) R^1 je H nebo NHR^3 , kde R^3 je acylový zbytek nerozvětvené nebo rozvětvené alifatické karboxylové kyseliny s 1 až 6 atomy uhlíku nebo benzoyl a R^2 je H , nebo

c) R^1 je $\text{H}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ a R^2 je COOalk , kde alk je nerozvětvený nebo rozvětvený alkylový řetězec s 1 až 14 atomy uhlíku.

Terapeuticky vhodné soli sloučenin vzorce I jsou také zahrnuty v rozsahu vynálezu.

Peptidy podle vynálezu se připravují postupem, který se vyznačuje tím, že se oxidační lineární peptid vzorce II,

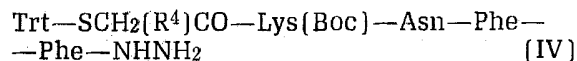


(III)

kde

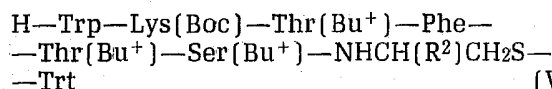
R^2 a R^4 mají význam uvedený výše, a pak se odštěpí zbylé chránicí skupiny reakcí s 50 až 100% kyselinou trifluoroctovou nebo roztokem minerální kyseliny.

Lineární peptidy vzorce II používané jako výchozí sloučeniny se snadno připraví postupem, který se vyznačuje tím, že se azidovou metodou nechá reagovat peptid vzorce IV



(IV)

s peptidem vzorce V,



(V)

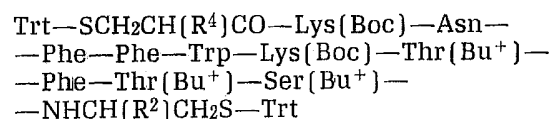
kde

R^2 a R^4 mají význam uvedený výše, za vzniku odpovídajícího lineárního peptidu

zí ze snadno dostupných materiálů a nepoužívají se škodlivá reakční činidla, probíhá snadno a používají se snadno odštěpitelné chránicí skupiny.

Předcházející výhody a vlastnosti prokazují, že peptidy podle vynálezu jsou použitelné při cukrovce a pro léčení akromegalie.

Vynález se týká peptidů obecného vzorce I,



(II)

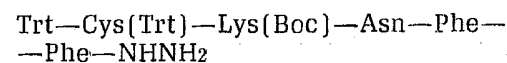
kde

a) R^2 je H nebo COOH a R^4 je $\text{Boc}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$, $\text{Boc}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ nebo $\text{Boc}-\text{Leu}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$, nebo

b) R^2 je H a R^4 je H nebo NHR^3 , kde R^3 má význam uvedený výše, nebo

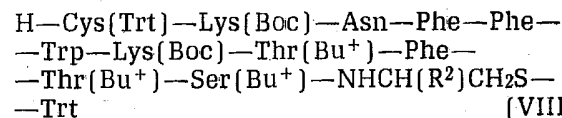
c) R^2 je COOalk a R^4 je $\text{Boc}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$, jodem nebo rhodanem za vzniku odpovídajícího derivátu cyklického disulfidu vzorce III,

vzorce II, kde R^2 a R^4 mají význam uvedený výše, nebo se azidovou metodou nechá reagovat pentapeptid vzorce VI



(VI)

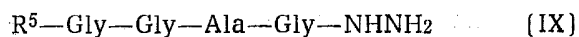
s peptidem vzorce V, kde R^2 je H nebo COOH , načež se odštěpením chránicí skupiny koncové aminoskupiny získá peptid vzorce VIII,



(VIII)

kde

R^2 je H nebo COOH , a posléze jmenovaná sloučenina se nechá azidovou metodou reagovat s peptidem vzorce IX,



(IX)

kde

R⁵ je Boc, Boc—Gly nebo Boc—Lleu, za vzniku odpovídajícího lineárního peptidu vzorce II, kde R² je H nebo COOH a R⁴ je Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—NH₂, Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—NH nebo Boc—Lleu—Gly—Gly—Ala—Gly—NH.

Obecně zkratky v popisu používané pro označení aminokyselin a chránicích skupin jsou založeny na doporučeních IUPAC—IUB Commission on Biochemical Nomenclature, viz Biochemistry, **11**, 1726—1732 (1972). Například Cys, Lys, Asn, Phe, Trp, Thr a Ser znamenají „zbytky“ L-cysteinu, L-lysinu, L-asparaginu, L-fenylalaninu, L-tryptofanu, L-threoninu a L-serinu.

Pod pojmem „zbytky“ se rozumějí zbytky odvozené od odpovídající L-aminokyseliny eliminací OH části karboxylové skupiny a H části aminoskupiny. Veškeré aminokyseliny mají přírodní L-konfiguraci.

Rada postupů a způsobů přípravy peptidů je dobře známa. Například funkční skupiny, které se netýkají tvorby peptidické vazby, se s výhodou chrání kondensační reakcí. Například chránicí skupiny vhodné pro chránění aminické funkční skupiny peptidu nebo aminokyseliny, které se nezúčastní tvorby peptidické vazby, jsou: alkoxykarbonyly, které zahrnují benzyloxykarbonyl (symbolisovaný jako Z), terc.butoxykarbonyl (symbolisovaný Boc), α,α -dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxykarbonyl (symbolisovaný Ddz), 2-(p-bifenylisopropoxykarbonyl (symbolisovaný Bpcc), p-chlorbenzyloxykarbonyl, p-methoxybenzyloxykarbonyl, isopropoxykarbonyl nebo ethoxykarbonyl; acylové chránicí skupiny zahrnují formyl, trifluoracetyl, italyl, acetyl (Ac), nebo toluensulfonyl, chránicí skupiny alkylového typu, které zahrnují trifenylmethyl nebo trityl (symbolisovaný Trt) nebo benzyl. Výhodnými chránicemi skupinami v postupu podle vynálezu jsou benzyloxykarbonyl, terc.butoxykarbonyl, trifenylmethyl a α,α -dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxykarbonyl. Chránicí skupiny pro hydroxylserinu a tyrosinu jsou acetyl, tosyl, benzoyl, terc.butyl (symbolisovaný Bu⁺), trityl a benzyl, výhodná chránicí skupina je terc.butyl. Chránicí skupiny na síře cysteinu nebo modifikovaném cysteinu jsou například benzyl, trifenylmethyl nebo trityl (symbolisovaný Trt), benzyloxykarbonyl nebo acetamidomethyl (symbolisovaný AcM), výhodnou chránicí skupinou jsou: trityl nebo acetamidomethyl. Karboxylová funkční skupina peptidu nebo aminokyseliny může být chráněna jako nižší alkylester nebo nižší arylalkylester včetně methylesteru (symbolisovaného OMe), ethylesteru (symbolisovaného OEt), benzylesteru (symbolisovaného OBzl) a také jako substituovaný hydrazid, který zahrnuje terc.butoxykarbonylhydrazid (NHNH Boc),

benzyloxykarbonylhydrazid (NHNHZ) nebo α,α -dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxykarbonylhydrazid (NHNHDDz).

Pro usnadnění kondensace peptidické karboxylové skupiny s volnou aminoskupinou jiného peptidu za vzniku nové peptidické vazby musí být koncová karboxylová skupina aktivována. Popis těchto skupin aktivujících karboxylovou skupinu je možno najít v obecných učebnicích chemie peptidů, jako je například K. D. Kopple, „Peptides and Amino Acids“, W. A. Benjamin, Inc., New York, 1966, str. 45—51 a E. Schröder a K. Lübke, „The Peptides“, vol. I, Academic Press, New York, 1965, str. 77—128. Příklady aktivovaných forem koncových karboxylových skupin jsou: chloridy kyselin, anhydridy kyselin, azidy kyselin, aktivované estery nebo o-acylmočoviny dialkylkarbodiimidu. Následující aktivované estery jsou zejména vhodné při postupu podle vynálezu: 2,4,5-trichlorfenyl (OTcp), pentachlorfenyl (OPcp), p-nitrofenyl (ONp), nebo 1-benzotriazolyl, rovněž vhodná pro tuto aktivaci je suksinimidoskupina.

Výraz „azidová metoda“, jak je v tomto popisu použit, se týká spojení dvou peptidických fragmentů, které se vyznačuje tím, že se hydrazid peptidu nechá reagovat s činidlem, které in situ poskytuje kyselinu dusitou. Výhodnými činidly pro tyto účely jsou organické nitrity, například terc.butyl-nitrit, isoamyl-nitrit, nebo dusitan alkalických kovů (např. dusitan sodný, dusitan draselný) v přítomnosti silné kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, sírová nebo fosforečná. Takto získaný odpovídající azid peptidu se pak nechá reagovat s petidem s volnou aminoskupinou a získá se požadovaný peptid. Výhodné podmínky pro azidovou metodu zahrnují reakci hydrazidu peptidu s kyselinou dusitou vyvíjenou in situ z organického dusitanu v přítomnosti silné kyseliny, s výhodou kyseliny chlorovodíkové (pH běžně od 0,1 do 2) v bezvodém inertním organickém rozpouštědle, například dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu, ethylacetátu, methylenchloridu, tetrahydrofuranu, dioxanu apod., při teplotě od —30 °C do 20 °C, s výhodou kolem —15 °C po dobu 10 až 30 minut, a získá se tak odpovídající azid. Azid peptidu se může izolovat a krystalovat a s výhodou se ponechává v reakční směsi. Pak se azid ve výše uvedenou reakční směs nechá reagovat s peptidovou jednotkou s volnou aminoskupinou při teplotě od —30 °C do 20 °C po dobu jedné až dvou hodin a pak při 0 až 30 stupních Celsia po dobu 10 až 30 hodin. Akceptor kyseliny, s výhodou organické báze, například N-ethyl-diisopropylamin, N-ethylmorfolin nebo triethylamin, se přidává do reakční směsi tak, aby reakční prostředí bylo mírně alkalické, s výhodou pH 7,0 až 7,5. Viz také výše uvedené učebnice Kop-

pleho nebo Schrödera a Lübkeho, kde jsou uvedeny další údaje o této metodě.

Výrazy „peptid, tripeptid, hexapeptid“ apod., jak jsou uvedeny zde, nejsou omezeny na odpovídající základní peptidy, ale rozumí se tím také modifikované peptidy s obměněnými nebo chráněnými skupinami. Výraz „peptidy“, jak je zde použit, se týká peptidů s dvěma až sedmnácti zbytky aminokyselin. Zbytek „ $\text{SCH}_2\text{CH}(\text{R}^1)\text{CO}$ “, jak je zde použit, se týká modifikovaného cysteinového zbytku, kde R^1 je H, nebo zbytku cysteinu, jestliže R^1 je NHR^3 , kde R^3 má význam uvedený výše $\text{H-Gly-Gly-Ala-Gly-NH}$, $\text{H-Gly-Gly-Gly-Ala-Gly-NH}$, $\text{H-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-NH}$ nebo H-Ala-Gly-NH . Kromě toho zbytek „ $\text{NHCH}(\text{R}^2)\text{CH}_2\text{S}$ “, jak je zde použit, znamená zbytek cysteinu, jestliže R^2 je COOH nebo COOalk , nebo modifikovaný zbytek cysteinu, jestliže R^2 je H.

Zkratka Me znamená methylskupinu a NHNH_2 znamená hydrazidovou skupinu.

Výraz „Nižší alkyl“, jak je zde použit, zahrnuje uhlovodíkové zbytky s jedním až třemi atomy uhlíku včetně methyly, ethyly a propyly. Symbol „alk“ znamená alkylovou skupinu s nerozvětveným nebo rozvětveným řetězcem s 1 až 14 atomy uhlíku.

Výraz „acyl“, jak je zde použit, zahrnuje nižší alifatické acyly s 1 až 6 atomy uhlíku, a to acyly s nerozvětveným nebo rozvětveným řetězcem, jako je formyl, acetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, pivaloyl, n-hexanoyl apod.

Výraz „alifatický acyl s 1 až 6 atomy uhlíku“ zahrnuje acylové skupiny s nerozvětveným nebo rozvětveným řetězcem, jako je formyl, acetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, pivaloyl, n-hexanoyl apod.

Výraz „minerální kyselina“, jak je zde použit, zahrnuje silné anorganické kyseliny, a to kyselinu chlorovodíkovou, bromovodíkovou, sírovou nebo fosforečnou. Jestliže se tento termín používá ve spojení s bezvodým systémem, je výhodnou kyselinou bezvodý chlorovodík.

Výraz „slabě kyselé podmínky“, jak je zde použit, zejména podmínky, při kterých se jako reakční prostředí používá zředěný vodný roztok organické kyseliny, například 30–80% vodné kyseliny mravenčí, octové nebo propionové, s výhodou 70 až 80% směs.

Výraz „mírně kyselé podmínky“, jak je zde použit, znamená podmínky, při kterých se koncentrované organické kyseliny nebo roztoky minerálních kyselin používají jako hlavní složka reakčního prostředí při teplotě asi od -30 do 30°C . Příklady výhodných podmínek v tomto případě jsou 50 až 100% kyselina trifluorooctová při teplotě od 0 do 30°C nebo 0,1 až 12 N kyselina chlorovodíková ve vodném roztoku nebo v roztoku v organickém rozpouštědle nebo chlorovodík v roztoku v bezvodém or-

ganickém rozpouštědle při -20 až 10°C .

Výraz „organický nitrit“ se používá pro obchodě dostupné nitrity, například terc.-butylnitrit, isoamylnitrit apod.

Výraz „organická báze“, jak je zde použit, zahrnuje triethylamin, N-ethylmorpholin, N-ethyldiisopropylamin apod.

Výraz „silná báze“, jak je zde použit, znamená jak organické báze popsané výše, tak silné anorganické báze včetně hydroxidů a uhličitánů sodíku a draslíku.

Peptidy podle vynálezu se získají ve formě volné báze nebo jako sůl s kyselinou buď přímo v postupu podle vynálezu, nebo reakcí peptidu s jedním nebo více ekvivalenty příslušné kyseliny. Příklady výhodných solí jsou ty s farmaceuticky vhodnými kyselinami, jako jsou například kyselina octová, mléčná, jantarová, benzoová, salicylová, methansulfonová nebo toluensulfonová, jakož i polymerní kyseliny, jako je tanin nebo karboxymethylcelulóza a soli anorganických kyselin, jako jsou halogenovodíkové kyseliny, například kyselina chlorovodíková, nebo kyselina sírová, nebo kyselina fosforečná. Je třeba uvést, že peptidy mají dva bazické dusíkové atomy a poskytují soli s jedním až dvěma ekvivalenty kyseliny. V případě potřeby se určité sůl s kyselinou převádí na jinou sůl s kyselinou, například sůl s netoxickou farmaceuticky vhodnou kyselinou působením příslušné iontoměničové pryskyřice způsobem popsaným R. A. Biossonem aj. *Helv. Chim. Acta* **43**, 1349 (1960). Vhodnými iontoměničovými pryskyřicemi jsou iontoměniče na bázi celulózy, například karboxymethylcelulóza nebo chemicky modifikovaný síťovaný dextranový katex, například typu Sefadexu C a silně bazická iontoměničová pryskyřice, například jaké jsou uvedeny v J. P. Greenstein a M. Winitz „Chemistry of the Amino Acids“, John Wiley and Sons, Inc., New York and London, 1961, Vol. 2, str. 1456.

Somatostatinové analogy vzorců I poskytují komplexní soli s ionty těžkých kovů. Příkladem farmaceuticky vhodných komplexů těžkých kovů je komplex tvořený zinkem nebo protaminem zinku.

Peptidy připravované postupem podle vynálezu, jakož i jejich odpovídající farmaceuticky vhodné soli jsou použitelné vzhledem k své farmakologické aktivitě, analogické přírodnímu tetradekapeptidu somatostatinu. Jejich aktivita byla prokázána farmakologickými testy, jako jsou modifikace [A. V. Schally aj., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 1314 (1973); J. Rivier aj., *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, **276**, 2737 (1973)] in vitro metody podle M. Saffran a A. V. Schally, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **33** 405 (1955).

Účinek peptidů vzorce I podle vynálezu byl prokázán také in vivo modifikací pentobarbitalem indukovaného zvýšení hladiny růstového hormonu v plasmě u krys, jak

je popsáno v práci Brazeaua aj. výše. Při tomto testu peptidy podle vynálezu vykazují účinek, který je větší nebo stejného řádu, jako je účinek somatostatinu.

Peptidy podle vynálezu jsou použitelné pro léčení akromegalie a příbuzných hypersekrečních endokrinních stavů a při diabetes u savců viz P. Brazeau aj., citace výše. Jestliže se peptidy nebo jejich soli použijí pro toto léčení, aplikují se systemicky, s výhodou parenterálně v kombinaci s farmaceuticky vhodnými kapalnými nosiči. Peptidy vzorce I mají nízkou toxicitu. Poměr peptidu nebo jeho soli se stanovuje podle rozpustnosti v uvedeném nosiči, podle uvedeného nosiče nebo podle způsobu aplikace. Jestliže se peptid nebo jeho sůl použije ve sterilním vodném roztoku, může tento roztok také obsahovat jiné rozpuštěné látky, jako jsou pufrы nebo konzervační látky, jakož i dostatečná množství farmaceuticky vhodných solí nebo glukózy, aby byl roztok izotonický. Dávky závisí na formě aplikace a zejména na druhu, který se má léčit, a s výhodou se pohybují mezi 1 μg až 300 μg na kg tělesné hmotnosti. Avšak dávka v rozmezí asi od 1 μg asi do 50 μg na kg tělesné hmotnosti se s výhodou používá pro dosažení účinných výsledků.

Peptidy nebo soli se mohou aplikovat v jedné dlouhodobě působící pomalu se uvolňující depotní dávkové formě popsané níže, s výhodou ve formě intramuskulární injekce nebo implantátu. Tyto dávkové formy jsou upraveny tak, že uvolňují asi od 1 μg asi do 50 μg na kg tělesné hmotnosti za den.

Často se požaduje aplikovat činidlo kontinuálně delší dobu v dlouhodobě, pomalu se uvolňující nebo depotní dávkové formě. Tyto dávkové formy mohou obsahovat buď farmaceuticky vhodnou sůl, nebo peptid s nízkou rozpustností v tělesných kapalinách, například jednu ze solí popsaných níže, nebo peptid ve formě ve vodě rozpustné soli spolu s ochranným nosičem, který brání rychlému uvolňování. V posledně uvedeném případě se peptid může například upravit s neantigenní částečně hydrolysovanou želatinou ve formě viskózní kapaliny nebo se může absorbovat na farmaceuticky vhodný pevný nosič, například hydroxid zinečnatý, a může se aplikovat v suspenzi ve farmaceuticky vhodném nosiči, nebo se může upravit na gely nebo suspenze s ochranným neantigenním hydrokolidem, například se sodnou solí karboxymethylcelulózy, polyvinylpyrrolidonem, alginátem sodným, želatinou, polygalakturonovými kyselinami, například pektinem, určitými mukopolysacharidy, spolu s vodnými nebo nevodnými farmaceuticky vhodnými kapalnými nosiči, konzervačními látkami nebo povrchově aktivními činidly. Příklady těchto preparátů je možno nalézt v standardních farmaceutických učebnicích, například v Reming-

ton's Pharmaceutical Sciences 14th Ed., Mack Publishing Co., Easton; Pennsylvania, 1970.

Dlouhodobé pomalu se uvolňující preparáty peptidu připraveného podle vynálezu se mohou také připravit mikroenkapsulací ve farmaceuticky vhodných povlácích, například v želatině, polyvinylalkoholu nebo ethylcelulóze. Další příklady materiálů pro povlaky a postupy pro mikroenkapsulaci jsou popsány v J. A. Herbig „Encyclopedia of Chemical Technology“, Vol. 13, 2nd Ed., Wiley, New York 1967, str 436–456. Tyto preparáty, jakož i suspenze nebo soli peptidu, které jsou pouze omezeně rozpustné v tělesných kapalinách, například soli pamoové kyseliny nebo taninu, se upravují tak, že uvolňují asi 1,0 mcg až asi 100 mcg aktivní sloučeniny na kg tělesné hmotnosti za den a s výhodou se aplikují intramuskulární injekcí. Alternativně se intramuskulární injekcí. Alternativně se některé pevné dávkové formy uvedené výše, například určité ve vodě omezeně rozpustné soli nebo disperse nebo adsorbáty na pevných nosičích nebo soli peptidu, například disperse v neutrálním hydrogelu polymeru ethylenglykolmethakrylátu nebo obdobných síťovaných monomerech, jak jsou popsány v US patentu č. 3 551 556, mohou také upravit na formu pilulek, které uvolňují stejné množství, jak bylo uvedeno výše, a mohou se implantovat podkožně nebo intramuskulárně.

Postup podle vynálezu je blíže objasněn v následujícím popisu, ve kterém je popsána příprava určitých peptidů vzorce I.

a) Sloučeniny vzorce I, kde $R^1 = \text{H} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Ala} - \text{Gly} - \text{NH} - \text{H} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Ala} - \text{Gly} - \text{NH} -$ nebo $\text{H} - \text{Leu} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Ala} - \text{Gly} - \text{NH} -$ a R^2 je H nebo COOH

Chráněný nižší alkylester alanyl-glycinu, s výhodou $\text{Boc} - \text{Ala} - \text{Gly} - \text{OMe}$ [popsaný H. U. Immer aj., *Helv. Chim. Acta.*, **57** 730 (1974)], se rozpustí v trifluoroctové kyselině a roztok se udržuje asi jednu hodinu na teplotě 0 až 10 °C a po odpaření trifluoroctové kyseliny se získá $\text{H} - \text{Ala} - \text{Gly} - \text{OMe}$ ve formě soli s trifluoroctovou kyselinou, která se může popřípadě převést a použít ve formě volné báze.

Ostatní štěpicí činidla pro odštěpení Boc chránicí skupiny jsou bromovodík v kyselině octové, alkoholický roztok chlorovodíku apod. Posledně jmenovaná sloučenina se rozpustí v inertním organickém rozpouštědle, s výhodou dimethylformamidu, a získaný roztok se ochladí na asi 0 až 10 °C. Přebytek, s výhodou 1,1 až 1,3 ekvivalentu organické báze, s výhodou N-ethylmorpholin, se přidá k roztoku a roztok má pak pH asi 8. Přidá se jeden ekvivalent chráněného aktivovaného esteru glycinu, s výhodou $\text{Boc} - \text{Gly} - \text{OTcp}$ [popsaný v J. Pless a R. A. Boissonnas *Helv. Chim. Acta* **46**, 1609

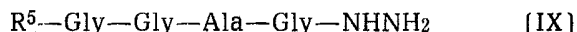
[1963]], a reakční směs se nechá stát asi dva dny při 0 až 20 °C. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek krystalizací poskytne chráněný nižší alkylester glycyl-alanyl-glycinu, s výhodou Boc—Gly—Ala—Gly—OMe, který reakcí s trifluoroctovou kyselinou poskytne výše uvedeným způsobem nižší alkylester tripeptidu glycyl-alanyl-glycinu, s výhodou H—Gly—Ala—Gly—OMe, ve formě soli s trifluoroctovou kyselinou, která se popřípadě převede na volnou bázi. Posledně uvedený tripeptid se nechá reagovat s Boc—Gly—OTcp výše uvedeným způsobem a získá se chráněný nižší alkylester glycyl-glycyl-alanyl-glycinu, s výhodou Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe, který reakcí s trifluoroctovou kyselinou poskytne výše uvedeným způsobem nižší alkylester glycyl-glycyl-alanyl-glycinu, s výhodou H—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe ve formě soli s trifluoroctovou kyselinou, která se může znovu převést na volnou bázi. Posledně uvedený tetrapeptid se nechá reagovat s chráněným aktivovaným esterem glycinu, s výhodou s Boc—Gly—OTcp, výše uvedeným způsobem a získá se nižší alkylester glycyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycinu, s výhodou Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe.

Výše uvedený tetrapeptid bez chránicí skupiny, H—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe, s výhodou ve formě soli s trifluoroctovou kyselinou, se nechá reagovat s chráněným aktivovaným esterem leucinu, s výhodou 1-benzotriazolylesterem terc.butyloxykarbonylleucinu při teplotě 0 až 15 °C v inertním organickém rozpouštědle, s výhodou dimethylformamidu, a to tak, že se smísí výše uvedený nechráněný tetrapeptid, v podstatě 1,5 až 2,0 ekvivalenty Boc—Leu—OH, 1,5 až 2,0 ekvivalenty 1-hydroxybenzotriazolu, 1,5 až 2,5 ekvivalentu dicyklohexylkarbodiimidu a přebytek organické báze, s výhodou N-ethylmorfolinu, aby pH roztoku bylo asi 8. Vzniklá směs se udržuje 20 až 30 hodin při 0 až 15 °C. Odstraněním sraženiny, odpařením filtrátu a krystalizací se získá chráněný nižší alkylester leucyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycinu, s výhodou Boc—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe.

Výše zmíněný tetrapeptid vzorce Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe a pentapeptidy vzorce Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe a Boc—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe se zde uvádějí jako R⁵—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe, kde R⁵ je Boc, Boc—Gly a Boc—Leu.

Posledně uvedené sloučeniny vzorce R⁵—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe, kde R⁵ má význam uvedený výše, se snadno převedou na odpovídající hydrazidy reakcí s přebytkem (20 až 50 molárních ekvivalentů) hydrazinhydrátu. Výhodné podmínky zahrnují reakci posledně jmenovaných esterů v inertním organickém rozpouštědle, například methanolu, n-butanolu nebo dimethylformamidu s 40 až 50 molárními ekvivalenty hydrazinhydrátu při 0 až 30 °C po dobu dvou

hodin až jednoho dne. Odpařením rozpouštědla a přebytku hydrazinhydrátu vznikne odpovídající aminochráněný hydrazid peptidu vzorce IX,

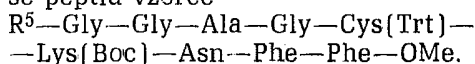


kde

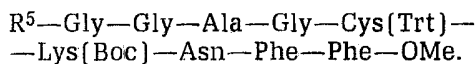
R⁵ je Boc, Boc—Gly nebo Boc—Leu.

Výše uvedený peptid vzorce IX a pentapeptid vzorce

H—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe (popsaný H. U. Immer aj. výše) se nechá reagovat azidovým způsobem a získá se peptid vzorce



Běžná a účinná metoda pro tento stupeň zahrnuje rozpuštění peptidu vzorce IX v inertním organickém rozpouštědle, s výhodou dimethylformamidu, nebo ve směsi dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu. Roztok asi dvou až pěti molárních ekvivalentů, s výhodou tří molárních ekvivalentů roztoku silné minerální kyseliny v organickém rozpouštědle, s výhodou chlorovodíku, v ethylacetátu, se přidá k posledně uvedenému roztoku při teplotě —20 °C až —10 °C, s výhodou při —15 °C, a k míchanému roztoku se přidá organický nitrit, s výhodou terc. butylnitrit (1,0 až 1,5 molárního ekvivalentu, s výhodou 1,2 ekvivalentu). Po 15 minutách při —20 °C až 0 °C se směs zalkalizuje, s výhodou na pH 7,0 až 7,5, přidáním organické báze, s výhodou N-ethyl-diisopropylaminu, a pak se přidá jeden ekvivalent výše uvedeného pentapeptidu. Dalším přidáním organické báze, s výhodou N-ethylmorfolinu, se směs mírně zalkalizuje. Reakční směs se pak míchá při —10 až 0 °C jednu až dvě hodiny a pak 20 až 30 hodin při 20 až 30 °C. Odpařením rozpouštědla, rozpuštěním zbytku v organickém rozpouštědle, s výhodou methanolu, přidáním k roztoku v rozpouštědle, ve kterém nastává vysrážení, s výhodou ve vodě nebo diethyletheru, a jímáním získaného produktu se získá výše uvedený peptid vzorce

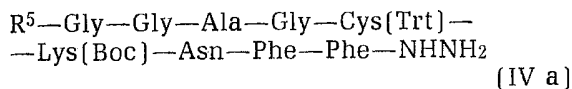


Výše popsany pentapeptidový fragment popsany výše v publikaci se snadno získá reakcí aktivovaného esteru Boc—Phe—OH s H—Phe—OMe a získá se Boc—Phe—Phe—OMe, který po odstranění koncové chránicí skupiny (Boc) za mírně kyselých podmínek poskytuje H—Phe—Phe—OMe. Posledně jmenovaná sloučenina se nechá reagovat s aktivovaným esterem Boc—Asn—OH a získá se Boc—Asn—Phe—Phe—OMe. Následujícím odštěpením skupiny chránicí koncovou aminoskupinu posledně uvedené

sloučeniny za mírně kyselých podmínek se získá tripeptid $\text{H}-\text{Asn}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{OMe}$.

Pak se posledně jmenovaná sloučenina použije pro získání požadovaného pentapeptidového fragmentu reakcí tripeptidu s aktivovaným esterem $\text{Z}-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{OH}$ a získá se $\text{Z}-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Asn}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{OMe}$, který hydrogenací v přítomnosti katalyzátoru vzácného kovu poskytne $\text{H}-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Asn}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{OMe}$, který se kondenzuje s aktivovaným esterem $\text{Trt}-\text{Cys}(\text{Trt})-\text{OH}$ a získá se $\text{Trt}-\text{Cys}(\text{Trt})-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Asn}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{OMe}$ a odštěpením koncové N-chránicí skupiny (Trt) v této posledně jmenované sloučenině za mírně kyselých podmínek se získá požadovaný pentapeptid $\text{H}-\text{Cys}(\text{Trt})-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Asn}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{OMe}$.

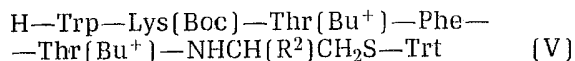
Při přípravě sloučeniny vzorce I výše, se výše uvedený ester peptidu $\text{R}^5-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Cys}(\text{Trt})-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Asn}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{OMe}$, kde R^5 má význam uvedený výše, převede na odpovídající hydrazid reakcí s přebytkem hydrazinhydrátu způsobem popsaným výše a získá se hydrazid peptidu vzorce IVa,



kde

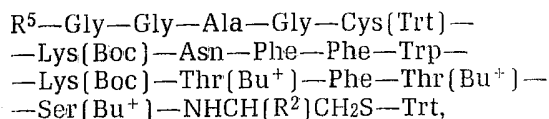
R^5 má význam uvedený zde nebo alternativně psaný jako peptid vzorce IV, kde R^4 je $\text{Boc}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$, $\text{Boc}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ nebo $\text{Boc}-\text{Leu}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$.

V následujícím stupni postupu podle vynálezu se uvedená posledně jmenovaná sloučenina vzorce IV a peptid vzorce V,



kde

R^2 je H nebo COOH , nechají reagovat azidovým způsobem popsaným výše na lineární peptid vzorce (IIa),



kde

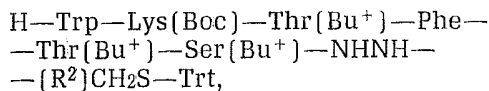
R^5 má význam uvedený výše a R^2 je H nebo COOH nebo alternativně psaný jako lineární peptid vzorce II, kde R^2 je H nebo COOH a R^4 je $\text{Boc}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$, $\text{Boc}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ nebo $\text{Boc}-\text{Leu}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$.

Běžný a účinný postup pro tento stupeň zahrnuje rozpuštění hydrazidu peptidu

vzorce IVa v dimethylformamidu. Roztok asi dvou až pěti molárních ekvivalentů, s výhodou tří molárních ekvivalentů, roztoku silné minerální kyseliny v organickém rozpouštědle, s výhodou chlorovodíku v ethylacetátu, se přidá k posledně uvedenému roztoku při -20 až -10 °C, s výhodou při -15 °C a za míchání se k tomuto roztoku přidá terc.butylnitrit (1,0 až 1,5 molárního ekvivalentu, s výhodou 1,2 ekvivalentu). Asi po 15 minutách při -20° až 10 stupních Celsia se přidá jeden ekvivalent peptidu vzorce V a organická báze, s výhodou tři až pět ekvivalentů N-ethyl-diisopropylaminu v dimethylformamidu, při teplotě asi -15 °C.

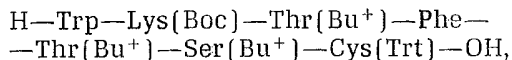
Reakční směs se pak míchá jednu až dvě hodiny při -20 °C až 0 °C a pak 15 až 25 hodin při 20 až 30 °C. Odpařením rozpouštědla, rozmělněním zbytku s vodou, methanolem nebo směsí methanolu a vodné kyseliny citrónové (2 až 5%) a oddělením pevných podílů se získá výše uvedený lineární peptid vzorce IIa, který se může použít bez dalšího čištění pro následující stupeň, viz níže.

Výše zmíněný peptid vzorce V,



kde

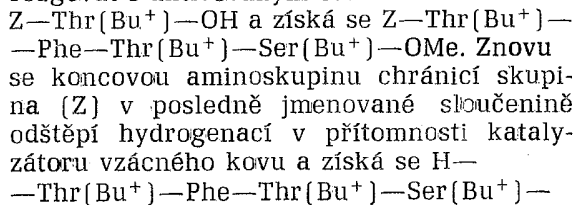
R^2 je COOH nebo alternativně psaný jako heptapeptid vzorce (Va)



popsaný H. U. Immer aj., citace výše a v USA patentu č. 3 917 578 z 4. XI. 1975, se snadno získá reakcí methylesteru O-t-butylserinu s aktivovaným esterem benzyloxykarbonyl-(O-t-butyl)threoninu a získá se $\text{Z}-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Ser}(\text{Bu}^+)-\text{OMe}$.

Chránicí skupiny koncové aminoskupiny (Z) se pak odstraní hydrogenací v přítomnosti katalyzátoru vzácného kovu a získá se $\text{H}-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Ser}(\text{Bu}^+)-\text{OMe}$.

Posledně uvedený methylester se pak nechá reagovat s aktivovaným esterem $\text{Z}-\text{Phe}-\text{OH}$ a získá se $\text{Z}-\text{Phe}-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Ser}(\text{Bu}^+)-\text{OMe}$, ze kterého se koncovou aminoskupinu chránicí skupina Z odstraní následující hydrogenací v přítomnosti katalyzátoru vzácného kovu a získá se $\text{H}-\text{Phe}-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Ser}(\text{Bu}^+)-\text{OMe}$. Pak se posledně uvedený ester tripeptidu nechá reagovat s aktivovaným esterem



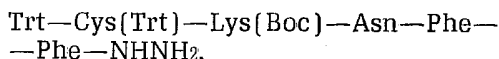
—OMe. Tato sloučenina se nechá reagovat s aktivovaným esterem $Z\text{—Lys(Boc)—OH}$ a získá se $Z\text{—Lys(Boc)—Thr(Bu}^+\text{)—Phe—Thr(Bu}^+\text{)—Ser(Bu}^+\text{)—OMe}$, a pak následuje odštěpení chránicí skupiny koncové aminoskupiny (Z) z posledně jmenované sloučeniny hydrogenací v přítomnosti katalyzátoru vzácného kovu a získá se $H\text{—Lys(Boc)—Thr(Bu}^+\text{)—Phe—Thr(Bu}^+\text{)—Ser(Bu}^+\text{)—OMe}$. Tato sloučenina se nyní nechá reagovat s aktivovaným esterem $Ddz\text{—Trp—OH}$ a získá se $Ddz\text{—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu}^+\text{)—Phe—Thr(Bu}^+\text{)—Ser(Bu}^+\text{)—OMe}$, který se nechá reagovat s hydrazinhydrátem a získá se odpovídající hydrazid hexapeptidu, $Ddz\text{—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu}^+\text{)—Phe—Thr(Bu}^+\text{)—Ser(Bu}^+\text{)—NHNH}_2$. Tento hexapeptid se nechá reagovat s $H\text{—Cys(Trt)—OH}$ azidovou metodou a získá se odpovídající heptapeptid, $Ddz\text{—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu}^+\text{)—Phe—Thr(Bu}^+\text{)—Ser(Bu}^+\text{)—Cys(Trt)—OH}$. Reakcí posledně jmenované sloučeniny za mírně kyselých podmínek se získá požadovaný heptapeptid vzorce Va nebo peptid vzorce V, kde R^2 je COOH.

Výše uvedený peptid vzorce V, kde R^2 je H, popsáný v USA patentu č. 3 917 581 z 4. XI. 1975, se získá snadno reakcí popsáného hydrazidu hexapeptidu vzorce $Ddz\text{—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu}^+\text{)—Phe—Thr(Bu}^+\text{)—Ser(Bu}^+\text{)—NHNH}_2$ s 2-tritylthioethylaminem azidovou metodou popsanou výše a získá se odpovídající hexapeptid vzorce $Ddz\text{—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu}^+\text{)—Phe—Thr(Bu}^+\text{)—Ser(Bu}^+\text{)—NHCH}_2\text{CH}_2\text{S—Trt}$. Tato sloučenina se pak nechá reagovat za mírně kyselých podmínek a získá se peptid vzorce V, kde R^2 je H ve formě soli s kyselinou mravenčí a popřípadě se tato převede na volnou bázi.

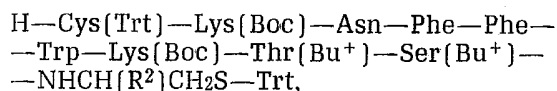
Alternativně se výše popsáný lineární peptid vzorce IIa snadno připraví následujícím způsobem:

Chráněný nižší alkylester pentapeptidu vzorce $Trt\text{—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe}$, popsáný výše, snadno převede na odpovídající hydrazid reakcí s přebytkem hydrazinhydrátu. Výhodné podmínky zahrnují reakci posledně uvedeného esteru v inertním rozpouštědle, například methanolu, butanolu nebo dimethylformamidu, s 20 až 40 molárními ekvivalenty hydrazinhydrátu po dobu jednoho až dvou dnů při teplotě 0 až 30 °C. Odštěpením roz-

pouštědla a krystalizací se získá odpovídající hydrazid pentapeptidu vzorce VI,



Posledně jmenovaná sloučenina, peptid vzorce V, kde R^2 je H nebo COOH, se nechá reagovat azidovou metodou způsobem popsaným výše a získá se peptid vzorce VIII, $Trt\text{—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu}^+\text{)—Phe—Thr(Bu}^+\text{)—Ser(Bu}^+\text{)—NHCH(R}^2\text{)CH}_2\text{S—Trt}$, kde R^2 je H nebo COOH, načež po odštěpení koncové N-chránicí skupiny (Trt) v posledně jmenované sloučenině VII se získá odpovídající peptid vzorce VIII,

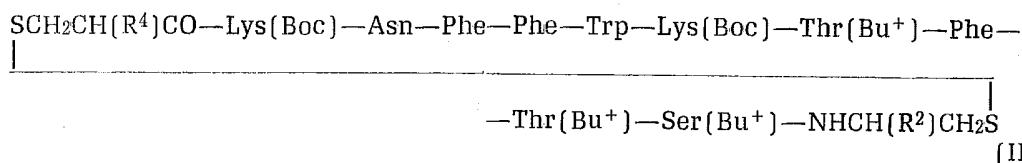


kde

R^2 je H nebo COOH. Odštěpení této chránicí skupiny (Trt) se provádí za mírně kyselých podmínek. Výhodné podmínky zahrnují rozpuštění peptidu vzorce VII ve směsi 5 až 15% kyseliny mravenčí v 60 až 80% kyselině octové, načež se reakční roztok nechá 3 až 10 hodin stát při 20 až 30 °C. Zahuštěním tohoto roztoku se získá peptid vzorce VIII, kde R^2 je H nebo COOH, ve formě soli s kyselinou, která se popřípadě může převést na volnou bázi.

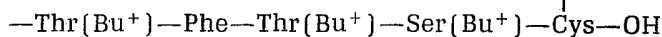
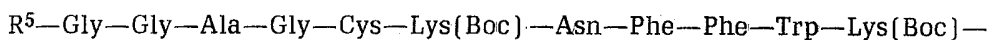
Posledně jmenovaná sloučenina vzorce VIII a hydrazid peptidu vzorce IX, kde R^5 má význam uvedený výše, se nechá reagovat azidovým způsobem popsaným výše a získá se odpovídající lineární peptid vzorce IIa nebo vzorce II, kde R^2 je H nebo COOH a R^4 je $\text{Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—NH—}$, $\text{—Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—NH}$ nebo $\text{Boc—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—NH—}$.

Převedení posledně jmenovaného lineárního peptidu vzorce II, získaného postupem popsaným výše, na odpovídající sloučeninu vzorce I se provádí běžně a účinně nejprve reakcí lineárního peptidu vzorce II s jódem, s výhodou v přítomnosti nižšího alkanolu nebo kyseliny octové, přičemž se současně odštěpí skupiny chránicí thiolové skupiny, například Trt, a vytvoří se disulfidový můstek za vzniku odpovídajícího cyklického disulfidového derivátu vzorce III,



kde

R^2 je H nebo COOH a R^4 je Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—NH, Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—NH nebo Boc—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—NH. Posledně jmenovaná sloučenina vzorce III, kde R^2 je



kde

R^5 má význam uvedený výše.

Následující reakcí sloučeniny vzorce III, kde R^2 je H nebo COOH a R^4 je Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—NH, Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—NH nebo Boc—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—NH, za mírně kyselých podmínek se odštěpí zbylé chránicí skupiny (to jest Boc a Bu^+) a získá se odpovídající sloučenina vzorce I, kde R^1 je H—Gly—Gly—Ala—Gly—NH, H—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—NH nebo H—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—NH a R^2 je H nebo COOH.

Při výhodném provedení se výše uvedená transformace lineárního peptidu vzorce IIa provádí tak, že se provede rozpuštění v kyselině octové nebo methanolu, ethanolu nebo jiném vhodném nižším alkanolu, například propanolu, isopropanolu nebo butanolu, a roztok se přidá k přebytku jódu (5 až 25, s výhodou 10 molárních ekvivalentů, rozpuštěných v jednom z výše uvedených rozpouštědel, s výhodou se používá 2 až 5% roztoku jódu v methanolu. Doba a teplota této reakce není rozhodující, avšak požaduje se, aby se reakce udržovala přidáváním roztoku jódu při teplotě 0 až 30 stupňů Celsia nebo aby se reakční směs chladila, nebo aby se použila kombinace obou způsobů. Za těchto podmínek trvá přidávání běžně 30 až 60 minut. Po skončení přidávání se směs míchá 30 až 120 minut při 20 až 30 °C, s výhodou se míchá 60 minut. Pak se reakční směs ochladí asi na 0 °C a přidá se přebytek mírného redukčního činidla, s výhodou thiosíranu sodného ve vodném roztoku. Směs se zahustí a zbytek se suspenduje ve vodě. Jímáním pevného podílu se získá odpovídající cyklický disulfid vzorce III a kde Boc a Bu^+ jsou ještě přítomné chránicí skupiny.

Alternativně se lineární peptid vzorce IIa může převést na výše zmíněný odpovídající cyklický disulfidový derivát vzorce IIIa způsobem popsaným v práci R. G. Hiskey a R. L. Smith, J. Amer. Chem. Soc., **90**, 2677 (1968) za použití rhodanu.

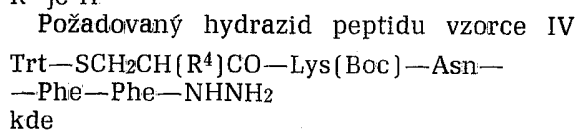
Nakonec se výše zmíněný cyklický disulfidový derivát vzorce III převede na odpovídající peptid vzorce I reakcí za mírně kyselých podmínek, přičemž se zbylé chránicí skupiny cyklického disulfidového derivátu odštěpí. Obecně se tento stupeň provádí rozpuštěním cyklického disulfidového

COOH a R^4 je Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—NH, Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—NH nebo Boc—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—NH, se může alternativně psát jako vzorec IIIa,

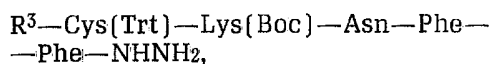
(IIIa)

derivátu ve vodném reakčním prostředí obsahujícím organickou kyselinu, při 0 až 20 stupních Celsia po dobu 10 až 60 minut. Příklady vhodných činidel jsou kyselina trifluoroctová, 10 až 20% vodná kyselina sírová, 10% kyselina fosforečná, 10 až 30% kyselina bromovodíková a 10 až 36% kyselina chlorovodíková. Zejména výhodným médiem je koncentrovaná kyselina chlorovodíková. Výhodné podmínky pro postup podle vynálezu jsou rozpuštění cyklického disulfidu v minimálním množství koncentrované kyseliny chlorovodíkové, ochlazené na 0 °C, a míchání reakční směsi 5 až 10 minut při 0 °C v atmosféře dusíku. Pak se přidá ledová kyselina octová (desetinásobek objemu) a roztok se ochladí asi na -70 °C a lyofilisuje se a získá se cyklický peptid vzorce I. Posledně uvedený produkt se dále čistí chromatografií na iontoměničích, s výhodou za použití karboxymethylcelulózového iontoměniče a octanu amonného jako elučního činidla. V tomto případě se produkt získá ve formě soli s octovou kyselinou. Alternativně se produkt čistí rozdělovací chromatografií na chemicky modifikovaném síťovaném dextranu, například Sephadexu LH-20 nebo Sephadexu G-25 použitím methanolu nebo kyseliny octové jako elučního činidla. V případě, že se použije Sephadex LH-20 a methanol jako eluční činidlo, získá se produkt ve formě hydrochloridu. V případě použití Sephadexu G-25 a kyseliny octové jako elučního činidla se produkt získá ve formě soli s kyselinou octovou. Opakovanou lyofilisací z vody produkt ve formě soli s kyselinou octovou poskytne téměř čistý peptid vzorce I, kde R^1 je H—Gly—Gly—Ala—Gly—NH, H—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—NH nebo H—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—NH a R^2 je H nebo COOH ve formě volné báze.

b) Sloučeniny vzorce I, kde R^1 je H nebo NHR^3 , kde R^3 má význam uvedený výše a R^2 je H



R^4 je NHR^3 , kde R^3 má význam uvedený výše, nebo alternativně psaný jako vzorec IVb,

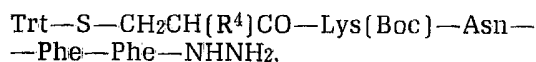


kde

R^3 má význam uvedený výše, se připraví acylací pentapeptidu vzorce $\text{H—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe}$ a získá se pentapeptid vzorce $\text{R}^3\text{—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe}$, který se podrobí hydrazinolyse za vzniku odpovídajícího hydrazidu pentapeptidu vzorce IV, kde R^4 je NHR^3 .

Ve výhodném provedení přípravy výše uvedeného pentapeptidu hydrazidu vzorce IVb se ekvimolární směs organické báze, s výhodou N-ethylmorpholinu a pentapeptidu vzorce $\text{H—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe}$, připraveného podle H. U. Immer aj., citace výše, v inertním organickém rozpouštědle, s výhodou diethylformamidu nebo tetrahydrofuranu, při teplotě asi 0 až 10 °C nechá reagovat s přebytkem, s výhodou 1,1 až 2 molárními ekvivalenty požadovaného p-nitrofenylacylátu nebo benzoátu, například p-nitrofenylacetátu, připraveného postupem popsáným F. D. Chattawayem J. Chem. Soc. 2495 (1931). Směs se pak udržuje 15 až 30 hodin při teplotě 0 až 10 °C a pak se odpaří. Odparek se rozpustí v polárním organickém rozpouštědle, s výhodou methanolu, a pomalu se přidá k nepolárnímu organickému rozpouštědlu s výhodou diethyletheru. Zbytek se oddělí a krystalizací se získá odpovídající acylovaný nebo benzoylovaný pentapeptid, například pentapeptid vzorce $\text{R}^3\text{—Cyse(Trt)Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe}$, kde R^3 má význam uvedený výše. Posledně jmenovaná sloučenina se rozpustí v inertním organickém rozpouštědle, například methanolu, ethanolu, dimethylformamidu apod., s výhodou v methanolu. Roztok se pak nechá reagovat s přebytkem hydrazinhydrátu, například s 15 až 30 molárními ekvivalenty. Reakční směs se udržuje 40 až 60 hodin při 0 až 10 °C. Sraženina se oddělí a vysuší a získá se uvedený hydrazid pentapeptidu vzorce IV, kde R^4 je NHR^3 , kde R^3 má význam uvedený výše, nebo vzorce IVb, kde R^3 má význam uvedený výše.

Podle dalšího rysu vynálezu se požadovaný hydrazid peptidu, tetrapeptidu vzorce IV,



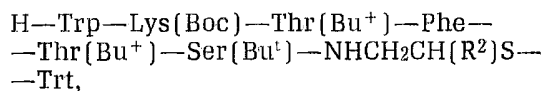
kde

R^4 je atom vodíku, připraví reakcí aktivovaného esteru 3-tritylthiopropionové kyseliny s tetrapeptidem vzorce $\text{H—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe}$ a získá se tetrapeptid vzorce $\text{Trt—SCH}_2\text{CH}_2\text{CO—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe}$, který se hydrazid

nolysuje na hydrazid tetrapeptidu vzorce IV, kde R^4 je atom vodíku.

Při výhodné provedení přípravy výše uvedeného hydrazidu tetrapeptidu se aktivovaný ester 3-tritylthiopropionové kyseliny, s výhodou pentachlorfenylester, připraví smíšením ekvimolárních množství 3-tritylthiopropionové kyseliny, pentachlorfenolu a dicyklohexylkarbodiimidu v inertním organickém rozpouštědle, s výhodou tetrahydrofuranu, při teplotě 0 až 10 °C. Směs se míchá asi jednu hodinu při 0 až 10 °C po dobu asi jedné hodiny a pak asi jednu hodinu při 20 až 30 °C. Směs se ochladí asi na 0 °C, přefiltruje se a filtrát se odpaří. Odparek se krystaluje a získá se pentachlorfenylester 3-tritylthiopropionové kyseliny. Roztok posledně jmenované sloučeniny a ekvimolárního množství tetrapeptidu vzorce $\text{H—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe}$, ve formě acetátu popsaného výše v odstavci a), v inertním organickém rozpouštědle, s výhodou diethylformamidu nebo tetrahydrofuranu, se nechá reagovat s téměř ekvimolárním množstvím organické báze, s výhodou triethylaminem, při teplotě 20 až 30 stupňů Celsia. Směs se míchá dva až tři dny při 20 až 30 °C a rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozmělní se studenou vodnou kyselinou citrónovou a vodou, vysuší se a krystalizací se získá tetrapeptid vzorce $\text{Trt—SCH}_2\text{CH}_2\text{CO—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe}$. Posledně jmenovaná sloučenina se rozpustí v inertním organickém rozpouštědle, například v methanolu, ethanolu nebo s výhodou dimethylformamidu. Roztok se nechá reagovat s přebytkem hydrazinhydrátu, například s 15 až 30 molárními ekvivalenty. Reakční směs se udržuje 20 až 30 hodin asi při 20 až 30 °C a odpaří se pak za sníženého tlaku. Odparek se rozmělní se studenou vodou, vysuší se a získá se hydrazid tetrapeptidu vzorce IV, kde R^4 je H.

V následujícím stupni postupu podle vynálezu se hydrazid peptidu vzorce IV, kde R^4 je H nebo NHR^3 , a peptid vzorce V

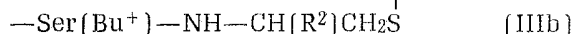
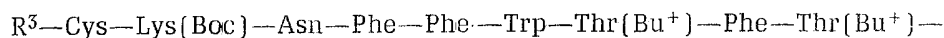


kde

R^2 je H popsáný výše v odstavci a), nechají reagovat azidovou metodou popsanou výše a získá se odpovídající lineární peptid vzorce II, kde R^2 je H a R^4 je H nebo NHR^3 .

Převedení posledně uvedeného lineárního peptidu vzorce II na odpovídající sloučeninu vzorce I se vhodně a účinně provádí tak, že se nejprve posledně jmenovaný lineární peptid vzorce II nechá reagovat s jódem, s výhodou v přítomnosti methanolu [jak je popsáno dříve například pro pří-

pravu derivátu cyklického disulfidu vzorce III v odstavci a)], přičemž proběhne odštěpení chránicí skupiny na thioolové skupině, to jest Trt, a tvorba disulfidového můstku za vzniku odpovídajícího derivátu



kde

R^2 je H a R^3 má význam uvedený výše.

Následující reakce posledně uvedené sloučeniny vzorce III, kde R^2 je H a R^4 je H nebo NHR^5 , se provádí za mírně kyselých podmínek, s výhodou koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou, ochlazenou asi na 0 °C [jak je popsáno výše pro přípravu cyklického peptidu vzorce I v odstavci a)], zbylé chránicí skupiny se odštěpí (to jest Boc a Bu^+) a získá se odpovídající peptid vzorce I, kde R^1 je H nebo NHR^5 , kde R^3 má význam uvedený výše a R^2 je H ve formě volné báze nebo soli s kyselinou.

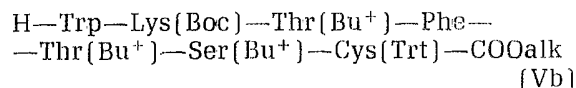
c) Sloučeniny vzorce I, kde R^1 je Boc—Ala—Gly—NH a R^2 je COOalk

Předložený první hydrazid peptidu vzorce IV, kde R^1 je Boc—Ala—Gly—NH, nebo alternativně psaný jako heptapeptid vzorce IVc.



je plně popsán v práci H. U. Immer aj., citace výše.

Požadovaný druhý peptid vzorce V, kde R^2 je COOalk, alternativně psaný jako ester heptapeptidu vzorce Vb,



se snadno připraví následujícím způsobem:

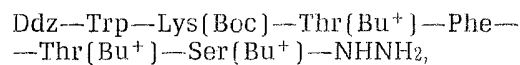
Heptapeptid vzorce $\text{Ddz---Trp---Lys(Boc)---Thr(Bu^+)---Phe---Thr(Bu^+)---Ser(Bu^+)---Cys(Trt)---OH}$ [popsaný výše v odstavci a)] v roztoku v inertním rozpouštědle se nechá reagovat s diazoalkanem vzorce $(\text{alk minus H})\text{N}_2$ v roztoku, inertním rozpouštědle, při teplotě od 0 do 20 °C po dobu od 1 do 48 hodin, rozpouštědlo a přebytek diazoalkanu se odpaří, odstraní se chránicí skupina Ddz a čištěním se získá odpovídající ester heptapeptidu vzorce Vb. Diazoalkany použitelné pro tyto účely jsou například diazomethan, diazoethan [von Pechmann, Ber. Deutsch. Chem. Ges. **31**, 2460 (1898) 1-diazopropan Niedlinger aj., Am. Chem. J. **43**, 378 (1910)], 2-diazopropan [Staudinger aj., Ber. Deutsch. Chem. Ges. **49**, 1905 (1916)], 1-diazobutan (Niedlin-

ger aj., citace výše, str. 380), 1-diazoisobutan (Adamson aj., J. Chem. Soc. 1935, 286), 4-diazo-2-methylbutan [Werner, J. Chem. Soc. **115**, 1101 (1919)], 1-diazopentan, 1-diazoheptan, 1-diazoheptan, nebo 1-diazo-oktan, přičemž poslední čtyři diazoalkany se připraví postupem popsáným Adamsonem aj., citace výše. Výhodnými inertními rozpouštědly jsou alkanoly, jako je methanol, a ethery, jako je diethylether.

Alternativně a zejména, jestliže se má získat peptid vzorce I, kde R^1 je H—Ala—Gly—NH— a R je COOalk, kde alkylová skupina (alk) obsahuje 9 až 14 atomů uhlíku, se nechá cystein reagovat s molárním přebytkem příslušného alkanolu alkOH, kde alk má význam uvedený výše v přítomnosti chlorovodíku při teplotě 25 až 120 °C, s výhodou při 100 až 120 °C, po dobu 1 až 5 hodin a získá se odpovídající hydrochlorid alkylesteru cysteinu. Posledně jmenovaná sloučenina se pak nechá reagovat s přibližně jedním molárním ekvivalentem trifenylkarbinolu v přítomnosti 0,1 až 1,0 molárního ekvivalentu bortrifluoridetherátu při teplotě 10 až 30 °C po dobu 0,5 až 3 hodin, s výhodou v přítomnosti 0,1 molárního ekvivalentu při 25 °C po dobu jedné hodiny, a získá se odpovídající alkylester H—Cys(Trt)—Oalk.

Posledně jmenovaný alkylester chráněného cysteinu se pak nechá reagovat azidovou metodou s chráněným hydrazidem hexapeptidu vzorce

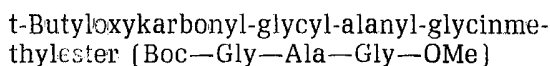
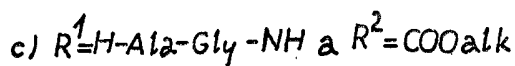
$\text{Ddz---Trp---Lys(Boc)---Thr(Bu^+)---Phe---Thr(Bu^+)---Ser(Bu^+)---NHNH}_2$,



popsaného výše v odstavci a), a získá se po odštěpení chránicí skupiny Ddz za mírných kyselých podmínek požadovaný druhý ester heptapeptidu vzorce Vb. Výhodné podmínky pro výše popsanou sekvenci reakcí zahrnují použití ekvimolárních částí uvedeného chráněného hydrazidu hexapeptidu a terc.butylnitritu v přítomnosti minerální kyseliny, s výhodou 2 až 3 molárních ekvivalentů chlorovodíku v inertním bezvodém rozpouštědle, s výhodou DMF, načež přidáním příslušného alkylesteru vzorce H—Cys(Trt)Oalk s 2 až 3 molárními ekvivalenty organické báze, s výhodou N-ethyl-diisopropylaminu, v inertním bezvodém rozpouštědle, s výhodou DMF, se provede reakce při —20 až 25 °C po dobu 6 až 12 hodin, a čištěním vzniklého chráně-

$R^5\text{-Gly-Gly-Ala-Gly}$ $\text{Cys-Lys-Asn-Phe-Phe}$ $\text{Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-}$
 $\text{NHCH(R}^2\text{)-CH}_2\text{S-Trt}$
 IX
 $\downarrow$
 IVa
 $\downarrow$
 $\text{IIa} \rightarrow \text{IIIa} \rightarrow \text{I}$

$R^5\text{-Gly-Gly-Ala-Gly}$ $\text{Cys-Lys-Asn-Phe-Phe}$ $\text{Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-}$
 $\text{NHCH(R}^2\text{)-CH}_2\text{S-Trt}$
 VI
 $\downarrow$
 VIII
 $\downarrow$
 $\text{IIa} \rightarrow \text{IIIa} \rightarrow \text{I}$



mmol) v dimethylformamidu (20 ml). Roztok se udržuje v lázni s ledem dva dny. Rozpouštědlo se odpaří a odparek se rozpustí v methanolu a produkt se vysráží diethyletherem. Krystalizací z ethylacetátu se získá sloučenina v nadpisu b. t. 103–105 stupňů Celsia a 141 °C (dimorfní); NMR 1,25 δ (3H), 1,38 δ (9H), 3,65 δ (3H).

Příklad 5

t-Butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycinhydrazid; IX, R⁵ = Boc [Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—NH—NH₂]

K studenému (lázeň s ledem) míchanému roztoku Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe (2,5 g, 6,7 mmol, popsanému v příkladu 4) v methanolu (50 ml) se přidá hydrazinhydrát (2,5 ml). Roztok se míchá při 0 °C tři hodiny a pak při teplotě místnosti přes noc. Sraženina se odfiltruje, promyje methanolem a vysušením se získá sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Gly 3, Ala 0,99.

Příklad 6

t-Butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinyl-N^ε-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninmethylester [Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe]

K roztoku Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—NH—NH₂ (1,57 g, 4,2 mmol, popsanému v příkladu 5) v dimethylsulfoxidu (25 ml) a dimethylformamidu (25 ml) se přidá 2,04 N roztok chlorovodíku v ethylacetátu (5,15 ml) při teplotě -10 °C. Roztok se ochladí na -12 °C a přidá se terc.butylnitrit (0,61 ml, 5,2 mmol). Roztok se 15 minut udržuje při -10 °C, ochladí se na -15 °C a nejprve se přidá N-ethyl-diisopropylamin (1,8 ml, pH 8) a pak roztok H—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe [4,5 g, 4,19 mmol, popsaný v práci H. U. Immer aj., *Helv. Chim. Acta*, **57**, 730 (1974)] a N-ethyl-diisopropylaminu (0,72 ml) v dimethylformamidu (25 ml). Směs se míchá jednu hodinu při -10 °C a přes noc při teplotě místnosti. Po odpaření se odparek rozpustí v methanolu, produkt se vysráží vodou a krystalizací z methanolu se získá sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 1,07; Asp, 0,97; Gly, 3,27; Ala, 1,0, Phe, 2,08, Cysteová kyselina 1,35.

Příklad 7

t-Butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinyl-N^ε-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninhydrazid, IV, R⁴ = Boc—Gly—Gly—

—Ala—Gly—NH [Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—NH—NH₂]

K studenému (lázeň s ledem) roztoku Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe (0,9 g, 0,66 mmol, popsanému v příkladu 6) v dimethylformamidu (25 ml) se přidá hydrazinhydrát (1,5 ml). Roztok se míchá 18 hodin při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odpaří a odparek se rozmělní s methanolem, vysuší nad kysličníkem fosforečným a získá se tak sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 1,10, Asp, 1,00, Gly, 3,33, Ala, 1,0, Phe, 2,14, Cysteová kyselina 1,35.

Příklad 8

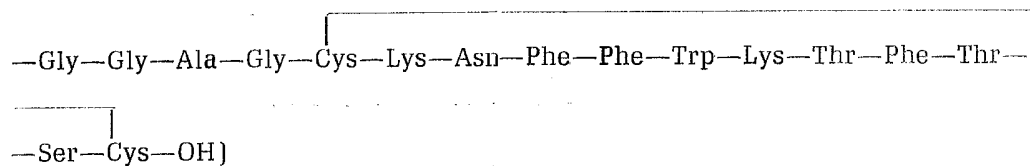
t-Butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinyl-N^ε-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^ε-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-S-trityl-cystein, II, R² = COOH a R⁴ = Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—NH [Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OH]

K roztoku Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—NHNH₂ (800 mg, 0,59 mmol, popsanému v příkladu 7) v dimethylformamidu (12 ml), míchanému při -20 °C se přidá 1,85 N roztok chlorovodíku v ethylacetátu (0,795 ml, 1,475 mmol). Směs se ochladí na -15 °C, přidá se terc.butylnitrit (0,081 ml, 0,71 mmol) a roztok se míchá 15 minut. Roztok H—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OH [816 mg, 0,59 mmol, popsaný H. U. Immer aj., *Helv. Chim. Acta*, **57**, 730 (1974)] a N-ethyl-diisopropylaminu (0,354 ml, 2,06 mmol) v dimethylformamidu (6 ml) se ochladí na -15 °C a přidá se k výše připravené reakční směsi. Směs se míchá jednu hodinu při -15 °C a 18 hodin při 25 °C. Rozpouštědlo se odpaří a odparek se rozmělní s ledem ochlazenou kyselinou citrónovou, přefiltruje se, promyje vodou, pak methanolem a získá se sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 1,94, Asp, 0,96, Thr, 1,64, Ser, 0,49, Gly, 2,82, Ala, 1,00, Phe, 2,80.

Příklad 9

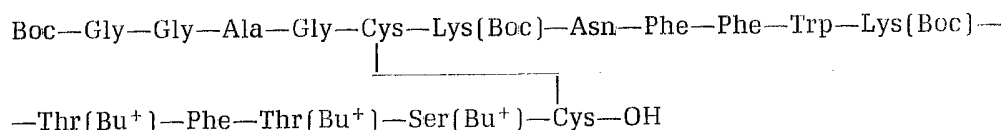
Cyklický sulfid glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-cysteinyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-lysyl-threonyl-fenylala-

nyl-threonylseryl-cysteinu, I, $R^1 = \text{H-Gly-Gly-Ala-Gly-NH}$ a $R^2 = \text{COOH}$ (H--



Boc-Gly-Gly-Ala-Gly-Cys(Trt)-
-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-
-Lys(Boc)-Thr(Bu^+)-Phe-Thr(Bu^+)-
-Ser(Bu^+)-Cys(Trt)-OH, popsaný v pří-
kladu 8 (0,871 g, 0,32 mmol) se rozpustí
v ledové kyselině octové (150 ml) a při
teplotě místnosti se přikape během jedné
hodiny k roztoku jódu v methanolu (0,5 %, 150 ml, 30 mmol). Směs se míchá dalších

45 minut, ochladí se v lázni s ledem a při-
dá se roztok thiosíranu sodného ve vodě
(1N, 6 ml) tak, aby se odstranil přebytek
jódu (bezbravý roztok). Rozpouštědlo se
odpaří a odparek se rozmělní s vodou, vy-
suší, suchý produkt se rozmělní s isopro-
pyleterem a získá se cyklických disulfid
hexadeka-peptidu vzorce III.



K posledně jmenované sloučenině se v
atmosféře dusíku za intenzivního míchání
v ledové lázni přidá studený koncentrova-
ný roztok kyseliny chlorovodíkové (23 ml).
V míchání se pokračuje ještě asi 10 minut,
k roztoku se přidá ledová kyselina octová
(300 ml) a roztok se lyofilisuje. Odparek
se rozpustí ve vodě a znovu se lyofilisuje.
Odparek se pak rozpustí v 0,01 N vodném
roztoku octanu amonného a nanese se na
kolonu karboxymethylcelulózy (Whatman
CM-23 $2,5 \times 30$ cm). Čistá sloučenina se
eluuje 0,06 N pufrém octanu amonného.
Čištěný materiál se lyofilisuje z vody a
získá se sloučenina uvedená v nadpisu ve
formě bílé pevné látky jako sůl s kyseli-

odpaří, odparek se rozmělní v etheru, pev-
ný podíl se odfiltruje, vysuší a získá se te-
trapeptid vzorce H-Gly-Gly-Ala-Gly-
-OMe, izolovaný ve formě soli s kyselinou
trifluorooctovou.

Roztok posledně uvedeného tetrapeptidu
(5,35 mmol), Boc-Leu-OH (2,31 g, 10
mmol), 1-hydroxybenzotriazolu (1,35 g, 10
mmol), dicyklohexylkarbodiimidu (2,27 g,
11 mmol) a N-ethylmorfolinu (0,68 ml) v
dimethylformamidu (25 ml) se míchá 24
hodin při 0 °C. Směs se filtrací zbaví sra-
ženiny a filtrát se přidá k 200 ml diethyl-
etheru. Sraženina se odfiltruje a krystali-
zací z methanolu a isopropyletheru se zís-
ká sloučenina uvedená v nadpisu b. t.
190,5–193 °C, $[\alpha]_D^{25} = -15,2^\circ$ ($c = 1$,
dimethylformamid).

MeOH
nou octovou; λ 282 nm (ϵ 5260), 289
max

nm (ϵ 4730), analýza aminokyselin: Lys, 2,28, Asp, 1,05, Thr, 1,95, Ser, 0,93, Cys, 2,34, Gly, 3,00, Ala, 1,05, Phe, 3,12. Opakovanou lyofilisací posledně jmenovaného produktu z vody se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě volné báze. Analýza amino-kyselin: Lys, 2,10, Asp, 1,04, Thr, 1,80, Ser, 0,95, Cys, 2,17, Gly, 3,00, Ala, 1,07, Phe, 2,99.

Analogickým způsobem, ale za použití rhodanu, postupem podle Hiskey a Smith, citace výše, místo jódu se získá také sloučenina uvedená v nadpisu.

Příklad 10

t-Butyloxykarbonyl-leucyl-glycyl-glycyl-ala-
nyl-glycinmethylester (Boc-Leu-Gly-
-Gly-Ala-Gly-OMe)

Roztok Boc-Gly-Gly-Ala-Gly-OMe (2,0 g, 5,35 mmol, popsaný v příkladu 4) v kyselině trifluorooctové (25 ml) se míchá jednu hodinu při 0 °C. Rozpouštědlo se

Příklad 11

t-Butyloxykarbonyl-leucyl-glycyl-glycyl-
-alanyl-glycinhydrazid, IX, $R^5 = \text{Boc-Leu}$
(Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-NHNH₂)

Roztok Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-
-OMe (2,0 g, 4 mmol, popsaný v příkladu 10) a hydrazinhydrátu (4,12 ml, 80 mmol) v methanolu (50 ml) se míchá 4 hodiny při 0 °C. Roztok se zahustí na 4 ml a přidá se k diethyletheru (200 ml). Sraženina se odfiltruje, rozpustí v methanolu (4 ml) a přidá se k diethyletheru (200 ml). Sraženina se odfiltruje, vysuší a získá se sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 174–176,5 °C, $[\alpha]_D^{24} = 12,0^\circ$ ($c = 1$, dimethylformamid).

Příklad 12

t-Butyloxykarbonyl-leucyl-glycyl-glycyl-
-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinyl-N^c-t-butyl-
oxykarbonyl-lysyl-asparaginyln-fenylalanyl-
-fenylalaninmethylester [Boc-Leu-Gly-
-Gly-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-
-Asn-Phe-Phe-OMe]

t-Butylnitrit (0,15 ml, 1,27 mmol) se přidá k roztoku Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-N₂H₃ (0,308 g, 0,635 mmol, popsanému v příkladu 11) v dimethylformamidu (5 ml) při -20 °C a 2,4 N kyseliny chlorovodíkové v ethylacetátu (0,66 ml, 1,59 mmol). Po patnáctiminutovém míchání při -20 °C se přidá roztok H-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe (0,62 g, 0,58 mmol, popsaný H. U. Immer aj., *Helv. Chim. Acta*, **57**, 730 [1974]) a diisopropylethylaminu (0,372 ml) v dimethylformamidu (6 ml). Po míchání 1 hodinu při -20 stupních Celsia a 24 hodin při 0 °C se roztok přidá k diethyletheru (200 ml). Sraženina se odfiltruje, rozpustí v methanolu (5 ml) a přidá se k diethyletheru (200 ml). Sraženina se odfiltruje, vysuší a získá se sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 238-240,5 °C.

Příklad 13

t-Butyloxykarbonyl-leucyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinyl-N^t-t-butyl-oxykarbonyllysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninhydrazid, IV, R⁴ = Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-NH [Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-NHNH₂]

Roztok Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-OMe (0,56 g, 0,38 mmol, popsaný v příkladu 12) a hydrazinhydrátu (0,74 ml) v dimethylformamidu (10 ml) se míchá 12 hodin při 0 °C a 24 hodin při 25 °C. Roztok se přidá k diethyletheru (100 ml). Sraženina se odfiltruje, rozpustí v dimethylformamidu (3 ml) a přidá se k diethyletheru (100 ml). Sraženina se odfiltruje, vysuší a získá se sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 239-242 °C. Analýza aminokyselin: Lys, 1,05, Cysteinová kyselina 0,66, Asp, 0,99, Gly, 3,00, Ala, 1,11, 1/2 Cys, 0,21, Leu, 0,96, Phe, 1,86.

Příklad 14

t-Butyloxykarbonyl-leucyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinyl-N^t-t-butyl-oxykarbonyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^t-t-butyl-oxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-S-trityl-cystein, II, R² = COOH a R⁴ = Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-NH [Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu⁺)-Phe-Thr(Bu⁺)-Ser(Bu⁺)-Cys(Trt)-OH]

t-Butylnitrit (0,03 ml, 0,28 mmol) se při -20 °C přidá k roztoku Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-N₂H₃ (0,20 g, 0,14 mmol, popsanému v příkladu 13) v dimethylsul-

foxidu (2 ml), dimethylformamidu (4 ml) a 2,21 N chlorovodíku v ethylacetátu (0,16 ml, 0,35 mmol). Po 15 minutovém míchání při -20 °C se přidá roztok H-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu⁺)-Phe-Thr(Bu⁺)-Ser(Bu⁺)-Cys(Trt)-OH.HCO₂H (0,20 g, 0,14 mmol, popsaný H. U. Immer aj., *Helv. Chim. Acta*, **57**, 730 [1974]) a diisopropylethylaminu (0,08 ml, 0,49 mmol) v dimethylformamidu (5 ml). Roztok se míchá jednu hodinu při -20 °C a 24 hodin při 0 °C. Roztok se zahustí na 2 ml a přidá se diethylether (100 ml). Sraženina se odfiltruje, promyje vodou (2 × 5 ml), methanolem (2 × 5 ml) a vysušením se získá sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 1,92, Cysteinová kyselina, 0,93, Asp, 0,93, Thr, 1,38, Ser, 0,66, Gly, 3,00, Ala, 1,02, 1/2 Cys, 0,39, Leu, 0,93, Phe, 2,70.

Příklad 15

Cyklický disulfid leucyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-cysteinyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-lysyl-threonyl-fenylalanyl-threonyl-seryl-cystein, I, R¹ = H-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-NH a R² = COOH (H-Leu-Gly-Gly-Ala-

Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-

Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH)

Roztok Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu⁺)-Phe-Thr(Bu⁺)-Ser(Bu⁺)-Cys(Trt)-OH (0,23 g, 0,081 mmol, popsaný v příkladu 14) v kyselině octové (90 ml) se přikape během jedné hodiny k roztoku 0,5 % jódu v methanolu (41,5 ml, 0,81 mmol). Po dokončení přidávání se roztok míchá při teplotě místnosti jednu hodinu a pak se ochladí na 0 °C. Pak se přidá thiosíran sodný (1,62 ml), až roztok zůstane bezbarvý. Rozpouštědlo se odpaří, zbytek se rozmělní s etherem a vysušením se získá cyklický disulfid heptadekapeptidu vzorce III.

Boc-Leu-Gly-Gly-Ala-Gly-Cys-

Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu⁺)-Phe-Thr(Bu⁺)-

Ser(Bu⁺)-Cys-OH (III)

Roztok cyklického disulfidu heptadekapeptidu (0,155 g, 0,066 mmol) v koncentrované kyselině chlorovodíkové (6,87 ml) se intenzívně míchá 8 minut při 0 °C. Přidá se kyselina octová (69 ml) a roztok se lyofilisuje. Zbytek se lyofilisuje z vody (50 ml). Odparek se chromatografuje na koloně

chemicky modifikovaného síťovaného dextranu „Sephadex G—25 M” [3 × 50 cm, ekvilibrovaného ve spodní fázi a pak v horní fázi směsí n-butanol—kyselina octová—voda (4 : 1 : 5)], přičemž vrchní fáze se použije pro desorpci peptidu. Frakce obsahující čistý peptid se spojí, odpaří a lyofilizací z vody se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě soli s kyselinou octo-

MeOH
vou. λ 290 (ϵ 5000), 281 (ϵ 5540), 275
max

(ϵ 5205), 269 (ϵ 4980), 265 (ϵ 4625), 259 nm (ϵ 4085). Opakovanou lyofilizací posledního produktu z vody se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě volné báze. Analýza aminokyselin: Lys, 1,98, Cysteo-
vá kyselina 1,41, Asp, 1,26, Thr, 1,92, Ser, 0,96, Gly, 3,00, Ala, 1,02, Leu, 0,96, Phe 2,76.

Stejným způsobem, ale použitím rhodanu, metodou podle Hiskey a Smith, citace výše, místo jódu se rovněž získá sloučenina uvedená v nadpisu.

Příklad 16

t-Butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycinmethylester (Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe)

Roztok Boc—Gly—OTcp (3,7 g, 10,04 mmol), H—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe . CF₃CO₂H (3,12 g, 8,03 mmol, popsáný v příkladu 10, a N-ethylmorpholinu (1,1 ml) v dimethylformamidu (15 ml) se míchá 20 hodin při 0 °C. Sraženina se odfiltruje a k diethyletheru se přidá filtrát. Spojené vysrážené podíly se krystalují z methanolu a získá se sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 198—201 °C, $[\alpha]_D^{24} = -3,9^\circ$, ($c = 1$, dimethylformamid).

Příklad 17

t-Butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycinhydrazid, IX, R⁵ = Boc—Gly (Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—NHNH₂)

Roztok Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—OMe (1,0 g, 2,32 mmol, popsáný v příkladu 16) a hydrazinhydrátu (1 ml, 23,2 mmol) v methanolu (30 ml) se míchá 4 hodiny při 0 °C. Po odpaření se zbytek rozmělní s diethyletherem a vysušením se získá sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 221—233 °C.

Příklad 18

N,S-Ditrityl-cysteinyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginy-fenyl-alanyl-fenyl-alaninhydrazid, VI, [Trt—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—NHNH₂]

Roztok Trt—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe [1,25 g, 1,0 mmol, po-

psaný v práci H. U. Immer aj., *Helv. Chim. Acta*, **57**, 730 [1974]] a hydrazinhydrátu (0,97 ml, 20 mmol) v methanolu (30 ml) se míchá při 0 °C dva dny. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se krystaluje ze směsi ethanolisopropylether a získá se sloučenina uvedená v nadpisu, NMR (DMSO—d₆): δ 1,38 (s, 9 H), 7,19—7,30 (m, 40 H).

Příklad 19

N,S-Ditrityl-cysteinyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenyl-alanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-S-trityl-cystein, VII, R² = COOH [Trt—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—The(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OH]

t-Butylnitrit (0,09 ml, 0,74 mmol) se při —20 °C přidá k roztoku Trt—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—NHNH₂ (0,62 g, 0,493 mmol, popsánému v příkladu 18) v dimethylformamidu (10 ml) a 2,6 N chlorovodíku v ethylacetátu (0,475 ml, 1,23 mmol). Po míchání při —20 °C po dobu 15 minut se přidá roztok H—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OH . HCOOH [0,70 g, 0,493 mmol, popsáný H. U. Immer aj., *Helv. Chim. Acta*, **57**, 730 [1974]] a diisopropylethylaminu (0,30 ml, 1,65 mmol) v dimethylformamidu (10 ml). Roztok se míchá při —20 °C jednu hodinu a při 25 °C 24 hodin a odpaří se. Odparek se rozmělní s vodou, diethyletherem, studenou 1 N kyselinou citrónovou a získá se sloučenina uvedená v nadpisu — NMR (CDCl₃) δ 1,08 a 1,13 (s, 27 H), 1,37 (s, 18 H), 7,28 (m, 60 H), analýza aminokyselin: Lys, 2,23, cysteo-
vá kyselina, 1,10, Asp, 1,00, Thr, 2,12, Ser, 1,02, 1/2 Cys, 0,64, Phe, 3,18.

Příklad 20

S-Trityl-cysteinyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-S-trityl-cysteinformiát, VIII, R² = COOH [H—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OH . HCOOH]

Roztok Trt—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OH (0,50 g, 0,192 mmol, popsáný v příkladu 19) v 6 ml směsi kyseliny octové, kyseliny mravenčí a vody (7 : 1 : 2) se míchá 6 hodin při 25 °C. Rozpouštědlo se odpaří, odparek se rozmělní s diethyletherem a získá se sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 2,23, cysteo-
vá kyselina,

1,38, Asp, 1,00, Thr, 2,14, Ser, 0,86, Phe, 3,24.

Příklad 21

t-Butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-S-trityl-cystein, II, R² = COOH a R⁵ = Boc-Gly-Gly-Gly-Ala-Gly-NH [Boc-Gly-Gly-Gly-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu⁺)-Phe-Thr(Bu⁺)-Ser(Bu⁺)-Cys(Trt)-OH]

t-Butylnitrit (0,04 ml, 0,34 mmol) se při -20 °C přidá k roztoku Boc-Gly-Gly-Ala-Gly-NHNH₂ (0,076 g, 0,176 mmol, popsanému v příkladu 17) v dimethylsulfoxidu (1 ml), dimethylformamidu (2 ml) a 2,5 N chlorovodíku v ethylacetátu (0,176 ml, 0,44 mmol). Po míchání 15 minut při -20 °C se přidá roztok H-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu⁺)-Phe-Thr(Bu⁺)-Cys(Trt)-OH. HCOOH (0,385 g, 0,16 mmol, popsaný v příkladu 20) a diisopropylethylaminu (0,12 ml) v dimethylformamidu (5 ml). Roztok se míchá jednu hodinu při -20 °C, jednu hodinu při 0 °C a 20 hodin při 25 °C. Rozpouštědlo se odpaří a odparek se přidá k diethyletheru (100 ml). Sraženina se odfiltruje, promyje vodou, methanolem a vysušením se získá sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 2,30, cysteinová kyselina, 1,42, Asp, 1,00, Thr, 2,27, Ser, 1,00, Gly, 3,84, Ala, 1,00, Phe, 3,34.

Příklad 22

Cyklický disulfid glycyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-cysteinyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-lysyl-threonyl-fenylalanyl-threonyl-seryl-cysteinu, I, R¹ = H-Gly-Gly-Gly-Ala-Gly-NH a R² = COOH (H-Gly-Gly-Gly-Ala-

—Gly—Cys—Lys—Asn—Phe—Phe—Trp—

—Lys—Thr—Phe—Thr—Ser—Cys—OH]

Roztok Boc-Gly-Gly-Gly-Ala-Gly-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu⁺)-Phe-Thr(Bu⁺)-Ser(Bu⁺)-Cys(Trt)-OH (0,285 g, 0,103 mmol, popsaný v příkladu 21) v kyselině octové (200 ml) se přidá během 60 minut k roztoku 0,5 % jódu v methanolu (50 ml, 1,03 mmol) a směs se míchá 60 minut při

teplotě místnosti. Roztok se ochladí na 0 °C a přidá se 1 N roztok thiosíranu sodného (2,06 mmol) a získá se bezbarvý roztok. Rozpouštědlo se odpaří a olejovitý zbytek se přidá do vody (100 ml). Sraženina se odfiltruje a vysušením se získá cyklický disulfid heptadekapeptidu vzorce III.

Boc-Gly-Gly-Gly-Ala-Gly-Cys—

—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—

—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)-Phe—Thr(Bu⁺)-

—Ser(Bu⁺)-Cys—OH

(III)

Roztok posledně zmíněného cyklického disulfidu heptadekapeptidu (0,10 mmol) v koncentrované kyselině chlorovodíkové (10 ml) se míchá 10 minut při 0 °C v atmosféře dusíku. Přidá se kyselina octová (100 ml) a roztok se lyofilisuje. Po další lyofilisaci z vody (100 ml) se roztok podrobí rozdělovací chromatografii na koloně chemicky modifikovaného síťovaného dextranu [„Sephadex G-25 M”, 3 × 50 cm, připravený ve spodní fázi směsí n-butanol-kyselina octová-voda (4 : 1 : 5) a pak ekvilibrovaný ve vrchní fázi] a použitím vrchní fáze směsi se desorbují téměř čistý heptadekapeptid. Čisté frakce se spojí, odpaří a lyofilisací se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě soli s kyselinou octovou

MeOH

λ 283 (ε 6702), 289 nm (ε 6350). Opa-max

kovanou lyofilisací posledně uvedeného produktu z vody se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě volné báze. Analýza aminokyselin: Lys, 2,00, cysteová kyselina, 1,42, Asp, 1,09, Thr, 1,89, Ser, 0,91, Gly, 3,64, Ala, 0,98, Phe, 295.

Stejným způsobem, ale použitím rhodanu, postupem podle Hiskey a Smith, citace výše, místo jódu se získá sloučenina uvedená v nadpisu.

Příklad 23

N,S-Ditrityl-cysteinyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-2-tritylthioethylamid, VII, R² = H [Trt-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu⁺)-Phe-Thr(Bu⁺)-Ser(Bu⁺)-NHCH₂CH₂S—Trt]

Hydrazid pentapeptidu Trt-Cys(Trt)-Lys(Boc)-Asn-Phe-Phe-NHNH₂ (0,80 g, 0,637 mmol, popsaný v příkladu 18) se rozpustí v bezvodém dimethylformamidu

[9 ml] a ochladí se na -20°C . Přidá se kyselina chlorovodíková v ethylacetátu (2,4 N, 0,691 ml) a pak terc.butylnitrit (0,0872 ml, 0,764 mmol). Směs se míchá 15 minut při -15°C . Roztok $\text{H}-\text{Trp}-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Phe}-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Ser}(\text{Bu}^+)-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{Trt}$ (0,852 g, 0,637 mmol), připravený podle USA patentu č. 3 917 581 z 4. XI. 1975, v dimethylformamidu (8 ml), obsahující N-ethyl-diisopropylamin (0,272 ml, 1,59 mmol), se ochladí na -15°C a přikape se k výše připravené reakční směsi. V míchání se pokračuje jednu hodinu při -15°C a při teplotě místnosti přes noc. Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku, odparek se rozmělní s vodou, přefiltruje se, promyje vodou a vysuší se nad kysličníkem fosforečným. Odparek se chromatografuje na koloně silikagelu (163 g) chloroformem obsahujícím methanol (3 %) a pyridin (0,3 %) jako elučním činidlem a čistý produkt se krystaluje ze směsi methanolu a isopropyletheru. Získá se sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 163–180 stupňů Celsia (rozk.).

Analýza pro $\text{C}_{149}\text{H}_{180}\text{N}_{16}\text{O}_{19}\text{S}_2$

vypočteno:

C 69,85, H 7,04, N 8,76 %;

nalezeno:

C 69,24, H 7,09, N 8,90 %.

Příklad 24

S-Trityl-cysteinyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginyl-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-2-tritylthioethylamid-formiát, VIII, $\text{R}^2 = \text{H}$ [$\text{H}-\text{Cys}(\text{Trt})-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Asn}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{Trp}-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Phe}-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Ser}(\text{Bu}^+)-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{Trt} \cdot \text{HCOOH}$]

Undekapeptid $\text{Trt}-\text{Cys}(\text{Trt})-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Asn}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{Trp}-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Phe}-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Ser}(\text{Bu}^+)-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{Trt}$ (0,909 g, 0,355 mmol, popsaný v příkladu 23) se rozpustí ve směsi kyseliny octové, kyseliny mravenčí a vody (7 : 1 : 2) (10 ml) a roztok se míchá přes noc při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odpaří a odparek se rozmělní s vodou. Získaná sloučenina se odfiltruje, promyje vodou a vysuší nad kysličníkem fosforečným. Pevný podíl se několikrát rozmělní se směsí petrolether/ether a vysušením se získá sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 2,03, Asp, 1,00, Ser, 0,87, Phe, 2,97, cysteová kyselina, 0,90, Thr, 1,85.

Příklad 25

t-Butyloxykarbonyl-leucyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinyl-N^e-t-butyl-

oxykarbonyl-lysyl-asparaginyl-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-2-tritylthioethylamid, II, $\text{R}^2 = \text{H}$ a $\text{R}^4 = \text{Boc}$ —
—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—NH [Boc—
—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(Trt)—
—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—
—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—
—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S—Trt]

Hydrazid pentapeptidu Boc—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—NHNH₂ (0,066 g, 0,136 mmol, popsaný v příkladu 11) se rozpustí v dimethylformamidu (3 ml) a ochladí se na -20°C . Přidá se kyselina chlorovodíková v ethylacetátu (2 N, 0,175 ml) a pak terc.butylnitrit (0,0186 ml, 0,163 mmol). Směs se míchá 15 minut při -15°C . Roztok $\text{H}-\text{Cys}(\text{Trt})-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Asn}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{Trp}-\text{Lys}(\text{Boc})-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Phe}-\text{Thr}(\text{Bu}^+)-\text{Ser}(\text{Bu}^+)-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{Trt}$ (0,315 g, 0,133 mmol), popsaný v příkladu 24, v dimethylformamidu (4 ml) a obsahující N-ethyl-diisopropylamin (0,082 ml, 0,476 mmol) se ochladí na -15°C a přikape se k výše připravené reakční směsi. V míchání se pokračuje jednu hodinu při -15°C a při teplotě místnosti přes noc. Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku, odparek se rozmělní ve studené kyselině citrónové (1 N), přefiltruje se a promyje vodou. Pevný podíl se rozmělní s methanolem a vysuší se nad kysličníkem fosforečným a získá se sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 1,88, Cysteová kyselina, 0,84, Asp, 1,00, Thr, 1,94, Ser, 0,97, Gly, 2,78, Ala, 0,89, Leu, 0,89, Phe, 3,11.

Příklad 26

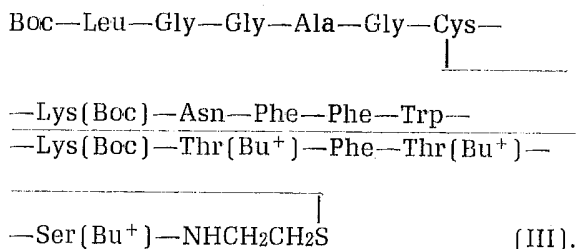
Cyklický disulfid leucyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-cysteinyl-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-lysyl-threonyl-fenylalanyl-threonyl-seryl-2-thioethylamid, I, $\text{R}^1 = \text{H}$ —
—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—NH a $\text{R}^2 = \text{H}$ [$\text{H}-\text{Leu}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Cys}-$

—Lys—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys—Thr—

—Phe—Thr—Ser—NHCH₂CH₂S)]

Roztok Boc—Leu—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S—Trt (0,230 g, 0,083 mmol, popsaný v příkladu 25) v kyselině octové (100 ml) se pomalu přidá k intenzivně míchanému roztoku jódu (0,211 g, 0,83 mmol) v methanolu (42 ml) při teplotě místnosti. Po skončení přidávání se roztok míchá 60 minut při teplotě místnosti. Roztok se ochladí na 0°C a

pro rozložení přebytku jódu se pomalu přidá roztok thiosíranu sodného ve vodě (1 N). Rozpouštědlo se odpaří téměř k suchu, zbytek se rozmělní se studenou vodou, přefiltruje se, promyje vodou a vysuší kysličníkem fosforečným. Pevný podíl se promyje etherem a vysušením se získá cyklický disulfid vzorce III.



Tento cyklický hexadekapeptid se intenzívně míchá při 0 °C v atmosféře dusíku 10 minut v koncentrované kyselině chlorovodíkové (7 ml). Přidá se kyselina octová (90 ml) a roztok se lyofilisuje. Odparek se dělí rozdělovací chromatografií na koloně chemicky modifikovaného síťovaného dextranu [„Sephadex C 25 M, 3 × 50 cm, ekvilibrovaného ve spodní fázi směsí n-butanol—kyselina octová—voda (4 : 1 : 5) a pak ekvilibrovaného ve vrchní fázi]. Použitím vrchní fáze se z kolony desorbuje v podstatě čistý hexadekapeptid. Čistě frakce se spojí, odpaří a lyofilisací se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě

MeOH
soli s kyselinou octovou, λ_{max} 290 (4,290),

282 (4,910), 273 nm (ε 4,630). Opakovanou lyofilisací posledně uvedeného produktu z vody se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě volné báze. Analýza aminokyselin: Lys, 2,01, Asp, 1,35, Ser, 0,93, Ala, 0,99, Phe, 2,52, Cysteová kyselina, 0,66, Thr, 1,98, Gly, 3,00, Leu, 0,96.

Příklad 27

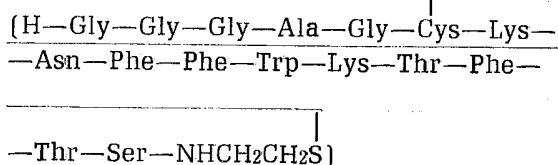
t-Butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinyl-N^e-t-butyl-oxykarbonyl-lysyl-asparaginylnyl-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^e-t-butyl-oxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonylnyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonylnyl-O-t-butyl-seryl-2-trityl-thioethylamid, II, R² = H a R⁴ = Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—NH [Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S—Trt]

Hydrazid pentapeptidu Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—NHNH₂ (0,0608 g, 0,141 mmol,

popsaný v příkladu 17) se rozpustí v bezvodém dimethylformamidu (6 ml) a dimethylsulfoxidu (2 ml) a ochladí se na —20 stupňů Celsia. Přidá se kyselina chlorovodíková v ethylacetátu [2 N, 0,176 ml, 0,352 mmol], pak terc.butylnitrit (0,0194 ml, 0,169 mmol). Směs se míchá 15 minut při —15 stupních Celsia a k této reakční směsi se přikape roztok H—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S—Trt (0,327 g, 0,138 mmol, popsaný v příkladu 24) v dimethylformamidu (4 ml), obsahující N-ethyl-diisopropylamin (0,085 ml, 0,494 mmol), ochlazený na —15 °C. V míchání se pokračuje jednu hodinu při —15 °C a přes noc při teplotě místnosti. Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku, odparek se rozmělní s ledem ochlazeným roztokem (1 N) kyseliny citrónové, přefiltruje se a promyje vodou. Pevný podíl se rozmělní s methanolem a vysuší se nad kysličníkem fosforečným a získá se sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 2,31, cysteová kyselina, 0,84, Asp, 1,00, Thr, 2,26, Ser, 1,19, Gly, 4,00, Ala, 0,84, Phe, 3,2.

Příklad 28

Cyklický disulfid glycyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-cysteinyl-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-lysyl-threonylnyl-fenylalanyl-threonylnyl-seryl-2-thioethylamid, I, R¹ = H—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—NH a R² = H



Roztok Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S—Trt (0,224 g, 0,083 mmol, popsaný v příkladu 27) v kyselině octové (160 ml) se pomalu přidá k intenzívně míchanému roztoku jódu (0,211 g, 0,83 mmol) v methanolu (42 ml) při teplotě místnosti. Po skončení přidávání se roztok míchá 60 minut při teplotě místnosti. Roztok se ochladí na 0 °C a roztokem thiosíranu sodného ve vodě (1 N), přidávaným pomalu, se rozloží přebytek jódu (bezbarvý roztok). Rozpouštědlo se odpaří téměř k suchu a odparek se rozmělní se studenou vodou, přefiltruje a vysuší nad kysličníkem fosforečným. Pevný podíl se promyje etherem a vysušením se získá cyklický disulfid vzorce III.

Boc—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys—

—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—

—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—

—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S.

(III)

Cyklický hexadeka-peptid se intenzívně míchá při 0 °C v atmosféře dusíku 10 minut v koncentrované kyselině chlorovodíkové (7 ml). Přidá se kyselina octová (90 ml) a roztok se lyofilisuje. Odparek se rozpustí v 2% kyselině octové ve vodě a lyofilisuje se. Odparek se dělí rozdělovací chromatografií na koloně chemicky modifikovaného síťovaného dextranu [„Sephadex G—25 M”, 3 × 50 cm, ekvilibrovaný ve spodní fázi směsí n-butanol—kyselina octová—voda (4 : 1 : 5) a pak ekvilibrovaný za použití vrchní fáze pro desorbci v podstatě čistého hexadeka-peptidu]. Čistě frakce se spojí, odpaří a lyofilisací se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě soli s kyseli-

MeOH
nou octovou, λ_{max} 288 (ε 4870), 280 (ε

Analýza aminokyselin: Lys, 1,72, Asp, 1,00, 5575), 274 (ε 5380), 268 (ε 5185), 265 nm (ε 4955). Opakovanou lyofilisací posledního produktu z vody se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě volné báze. Ser, 0,73, Ala, 0,69, Phe, 2,78, Cysteová kyselina 0,57, Thr, 1,69, Gly, 3,59.

Příklad 29

t-Butyloxykarbonyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-S-trityl-cysteinyl-N^ε-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginyl-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^ε-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-2-trityl-thioethylamid, II, R² = H a R⁴ = Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—NH [Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(Trt)]—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂—Trt]

K roztoku Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—NHNH₂ (800 mg, 0,59 mmol, připravenému podle příkladu 7) v dimethylformamidu (12 ml) se při —20 °C přidá za míchání 1,85 N roztok chlorovodíku v ethylacetátu (0,795 ml, 1,475 mmol). Směs se ochladí na —15 °C, přidá se terc.butylnitrit (0,081 ml, 0,71 mmol) a roztok se míchá 15 minut. K takto připravené reakční směsi se přidá roztok H—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂—

—S—Trt (0,852 g, 0,637 mmol), připravený postupem podle USA patentu č. 3 917 581 z 4. XI. 1975, a N-ethyl-diisopropylaminu (0,354 ml, 2,06 mmol) v dimethylformamidu (6,0 ml), ochlazený na —15 °C. Směs se míchá jednu hodinu při —15 °C a 18 hodin při 25 °C. Rozpouštědlo se odpaří a odparek se rozmělní s ledem ochlazenou kyselinou citrónovou, přefiltruje se, promyje vodou a methanolem a vysušením se získá sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 2,01, Asp, 0,97, Thr, 1,60, Ser, 0,65, Cysteová kyselina, 0,87, Gly, 2,92, Ala, 1,00, Phe, 2,97.

Příklad 30

Cyklický disulfid glycyl-glycyl-alanyl-glycyl-cysteinyl-lysyl-asparaginyl-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-lysyl-threonyl-fenylalanyl-threonyl-seryl-2-thioethylamid, I, R¹ = H—Gly—Gly—Gly—Ala—Gly—NH a R² = H (H—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys—

—Lys—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys—Thr—

—Phe—Thr—Ser—NHCH₂CH₂S)

Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S—Trt, popsaný v příkladu 29 (0,860 g, 0,30 mmol), se rozpustí v ledové kyselině octové (150 ml) a přikape se při teplotě místnosti k roztoku jódu v methanolu (0,5 %, 150 ml, 30 mmol) a reakční směs se míchá jednu hodinu. Směs se míchá dalších 45 minut, ochladí se v lázni s ledem a roztok thiosíranu sodného ve vodě (1 N, 6 ml) se přidá, aby se rozložil přebytek jódu (bezbarvý roztok. Roztok se odpaří a zbytek se rozmělní s vodou, vysuší a bezvodý produkt se rozmělní s isopropyletherem a získá se cyklický disulfid pentadeka-peptidu vzorce III.

Boc—Gly—Gly—Ala—Gly—Cys—Lys(Boc)—

—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—

—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—

—NHCH₂CH₂S

(III)

K posledně jmenované sloučenině se přidá studená koncentrovaná kyselina chlorovodíková (23 ml) za míchání v lázni s ledem a v atmosféře dusíku. V míchání se pokračuje 10 minut, přidá se ledová kyselina octová a roztok se lyofilisuje. Odparek se rozpustí ve vodě a znovu se lyofilisuje. Odparek se rozpustí v 0,01 N vodném octanu amonném a nanese se na kolonu

karboxymethylcelulózy („Whatman CM—23” 2,5 × 30 cm). Čistá sloučenina se eluuje 0,06 N puforem octanu amonného. Čistěný materiál se lyofilisuje z vody a získá se sloučenina uvedená v nadpisu ve formě bílé pevné látky jako sůl s kyselinou oc-

MeOH
tovou λ 282 nm (ϵ 5120), 289 nm
max

(ϵ 4610). Opakovanou lyofilisací posledně jmenovaného produktu z vody se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě volné báze. Analýza aminokyselin: Lys, 2,06, Asp, 1,02, Thr, 1,75, Ser, 0,91, cysteová kyselina, 0,73, Gly, 3,00, Ala, 1,10, Phe, 3,11.

Analogickým způsobem, ale použitím rhodanu způsobem podle práce Hiskey a Smith, citace výše, místo jódu se také získá sloučenina uvedená v nadpisu.

Příklad 31

Acetyl-(S-trityl)cysteinyl-(N-t-butoxykarbonyl)lysyl-asparaginyl-fenylalanyl-fenylalaninmethylester [Ac—Cys(Trt)—
—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe]

Roztok p-nitrofenylacetátu [0,191 g, 1,05 mmol, připravený postupem F. D. Chattaway, J. Chem. Soc., 2495 (1931)] v dimethylformamidu (4 ml) se při 0 °C přidá k roztoku H—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe.HOAc (0,750 g, 0,698 mmol, připravenému podle H. U. Immer aj., Helv. Chim. Acta., 57, 730 (1974) a N-ethylmorpholinu (0,1 ml). Po 24 hodinách míchá ní při 0 °C se rozpouštědlo odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí v methanolu (3 ml) a pomalu se přidává k diethyletheru (200 ml). Sraženina se odfiltruje a krystalizací z ethanolu se získá sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 219,5—221 °C, $[\alpha]_D^{25} = -21,6^\circ$ ($c = 1$, dimethylformamid).

Stejným způsobem za použití p-nitrofenylesterů kyseliny mravenčí, propionové, máselné, isomáselné, pivalové, n-hexanové nebo kyseliny benzoové místo p-nitrofenylacetátu se připraví odpovídající sloučeniny výše uvedeného vzorce, kde Ac je nahrazena za formyl, propionyl, n-butanoyl, isobutanoyl, pivaloyl, n-hexanoyl nebo benzo-yl zbytky.

Příklad 32

Acetyl-(S-trityl)cysteinyl-(N-t-butoxykarbonyl)lysyl-asparaginyl-fenylalanyl-fenylalaninhydrazid, IV, $R^4 = \text{NHCOCH}_3$ [Ac—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—
—NHNH₂]

Roztok Ac—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe (0,40 g, 0,379 mmol, popsaný v příkladu 31) a hydrazinhydrát (0,37

ml, 7,58 mmol) v methanolu (15 ml) se míchá 48 hodin při 0 °C. Sraženina se odfiltruje a vysušením se získá sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 236—237 °C, $[\alpha]_D^{25} = -28,6^\circ$ ($c = 1$, dimethylformamid).

Stejným způsobem, použitím příslušných ostatních výchozích materiálů, popsaných v příkladu 31, se získají odpovídající sloučeniny vzorce IV, kde R^4 je NHR³, kde R³ je formyl, propionyl, n-butanoyl, isobutanoyl, pivaloyl, n-hexanoyl nebo benzoyl.

Příklad 33

Acetyl-(S-trityl)cysteinyl-(N^ε-t-butoxykarbonyl)lysyl-asparaginyl-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-(N^ε-t-butoxykarbonyl)lysyl-(O-t-butyl)-threonyl-fenylalanyl-(O-t-butyl)threonyl-(O-t-butyl)-seryl-2-tritylthioethylamid, II, $R^2 = \text{H}$ a $R^4 = \text{NHCOCH}_3$ [Ac—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—
—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—
—Ser(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S—Trt]

Roztok Ac—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—NHNH₂ (IV) (0,240 g, 0,227 mmol, popsaný v příkladu 32) v bezvodém dimethylformamidu (2 ml) a dimethylsulfoxidu (1 ml) se ochladí na —20 °C. Přidá se kyselina chlorovodíková v ethylacetátu (2,1 N, 0,273 mmol) a pak t-butylnitrit (0,0312 ml, 0,273 mmol). Směs se míchá 15 minut při —15 °C a k této reakční směsi se přikape roztok H—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S—Trt (V, 0,304 g, 0,227 mmol), připravovaný postupem podle USA patentu č. 3 917 581 z 4. XI. 1975, v dimethylformamidu (3 ml), obsahující N-ethyl-diisopropylamin (0,097 ml, 0,568 mmol), ochlazený na —15 °C. Směs se míchá jednu hodinu při —15 °C a pak 20 hodin při 25 °C. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozmělní s ledem ochlazenou kyselinou citrónovou (1 N), přefiltruje se, promyje vodou a vysuší nad kyslíčnickem fosforečným. Pevný zbytek se rozmělní s methanolem, přefiltruje se, vysuší nad kyslíčnickem fosforečným a získá se sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 1,82, Asp, 1,00, Ser, 0,76, cysteová kyselina, 0,93, Thr, 1,87, Phe, 3,10.

Stejným způsobem, ale použitím odpovídajících ostatních výchozích materiálů vzorce IV, kde R^4 je NHR³ popsaný v příkladu 32, získají se odpovídající sloučeniny vzorce II, kde R^2 je H a R^4 je NHR³, R³ je formyl, propionyl, n-butanoyl, isobutanoyl, pivaloyl, n-hexanoyl nebo benzoyl.

Příklad 34

Cyklický disulfid acetyl-cysteinyl-lysyl-asparaginyl-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofenyl-lysyl-threonyl-fenylalanyl-threonyl-

-seryl-2-thioethylamid, I. $R^1 = \text{NHCOCH}_3$ a $R^2 = \text{H}$ (Ac—Cys—Lys—Asn—Phe—Phe—

—Trp—Lys—Thr—Phe—Thr—Ser—

—NHCH₂CH₂S)

Roztok Ac—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S—Trt (0,260 g, 0,110 mmol, popsaný v příkladu 33) v kyselině octové (61 ml) se pomalu přidává k míchanému roztoku jódu (0,278 g, 1,1 mmol) v methanolu (56 ml) při 25 °C. Po skončení přidávání se roztok míchá jednu hodinu při 25 °C. Roztok se ochladí na 0 °C a roztok 1 N thio-síranu sodného ve vodě se pomalu přidává, aby se rozložil přebytek jódu (bezbarvý roztok). Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a odparek se rozmělní s vodou. Sraženina se odfiltruje, promyje vodou a vysuší nad kyslíčným fosforečným a získá se cyklický chráněný undeka-peptid vzor-
ce III.

Ac—Cys—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—

—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—

—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S

(III)

Posledně jmenovaný cyklický peptid se intenzívně míchá při 0 °C v atmosféře dusíku 10 minut v koncentrované kyselině chlorovodíkové (9,1 ml). Přidá se kyselina octová (119 ml) a roztok se ihned lyofilisuje. Odparek se rozpustí v horní fázi systému rozpouštědel butanol—kyselina octová—voda (4 : 1 : 5) a nanese se na kolonu chemicky modifikovaného síťovaného dextranu (Sephadex 6—25M), připraveného ve spodní fázi rozpouštěcího systému. Vrchní fáze výše uvedeného systému rozpouštědel se použije po desorpci undeka-peptidu. Frakce obsahující čistý produkt se spojí a odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozmělní v diethyletheru, rozpustí se v 5% kyselině octové a lyofilisací se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě soli s kyselinou octovou. UV (methanol) λ max 290 (ϵ 4990), 282 (ϵ 5455), 274 nm (ϵ 5095).

Posledně jmenovaná sloučenina ve formě soli s kyselinou octovou se podrobí opakované lyofilisaci z vody a získá se sloučenina uvedená v nadpisu ve formě volné báze. Analýza aminokyselin: Lys, 1,93, Asp, 1,00, Ser, 0,84, cysteová kyselina, 0,80, Thr, 1,84, Phe, 2,97.

Stejným způsobem použitím příslušných

ostatních výchozích materiálů vzorce II, kde R^2 je H a R^4 je NHR³ popsáný v příkladu 33, se získají odpovídající sloučeniny vzorců III a I, kde R^2 je H a R^4 a R^1 , resp. jsou NHR³, kde R^3 je formyl, propionyl, n-butanoyl, isobutanoyl, pivaloyl, n-hexanoyl nebo benzoyl.

Příklad 35

Pentachlorofenylester 3-tritylthiopropionové kyseliny (Trt—S—CH₂CH₂COOPcp)

3-Tritylthiopropionová kyselina [1, Og, 2,87 mmol, popsaná R. C. Hiskey a M. A. Harpold, J. Org. Chem., **33**, 559 (1968)] se rozpustí v tetrahydrofuranu (25 ml) a přidá se pentachlorofenol (0,765 g, 2,87 mmol). Směs se ochladí na 0 °C, přidá se dicyklohexylkarbodiimid (0,596 g, 2,87 mmol) a reakční směs se míchá jednu hodinu při 0 °C a jednu hodinu při 25 °C. Reakční směs se pak ochladí na 0 °C, přefiltruje se a filtrát se odpaří za sníženého tlaku. Odparek se krystaluje z ethylacetátu a získá se sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 154—156 °C.

Příklad 36

3-Tritylthiopropionyl-(N^t-butoxykarbonyl)lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninmethylester [Trt—SCH₂CH₂CO—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe]

Roztok pentachlorofenylesteru 3-tritylthiopropionové kyseliny (0,597 g, 1 mmol, popsáný v příkladu 35), H—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe.HOAc [1 mmol, připravený podle H. U. Immer aj., Helv. Chim. Acta., **57**, 730 (1974)] a triethylaminu (0,14 ml, 1 mmol) se míchá tři dny při 25 °C. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozmělní v ledem ochlazeném roztoku 1 N kyseliny citrónové, přefiltruje se, promyje vodou a vysuší hydroxidem draselným. Pevný podíl se krystaluje z methanolu a získá se sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 215—220 °C.

Příklad 37

3-Tritylthiopropionyl-(N^t-butoxykarbonyl)lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalaninhydrazid, IV, $R^4 = \text{H}$ [Trt—SCH₂CH₂CO—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—NHNH₂]

Roztok Trt—SCH₂CH₂CO—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—OMe (0,900 g, 0,9 mmol, popsáný v příkladu 36) a hydrazinhydrát (1 ml) v dimethylformamidu (20 ml) se míchá 20 hodin při 25 °C. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozmělní ve studené vodě, přefiltruje se, promyje se s vodou a vysušením se získá sloučenina uvedená v nadpisu, b. t. 225—235 °C.

Příklad 38

3-Tritylthiopropionyl-(N^e-t-butoxykarbonyl)lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-(N^e-t-butoxykarbonyl)lysyl-[O-t-butyl]threonyl-fenylalanyl-(O-t-butyl)threonyl-[O-t-butyl]seryl-2-tritylthioethylamid, II, R² a R⁴ = H [Trt—
—SCH₂CH₂CO—Lys(Boc)—Asn—Phe—
—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—
—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S—
—Trt]

Roztok Trt—SCH₂CH₂CO—Lys(Boc)—
—Asn—Phe—Phe—NHNH₂ (0,500 g, 0,5 mmol, popsaný v příkladu 37) v dimethylsulfoxidu (5 ml) a dimethylformamidu (20 ml) se ochladí na -20 °C. Pak se přidá roztok kyseliny chlorovodíkové v ethylacetátu (1,4 N, 0,895 ml) a pak terc.butylinitrit (0,069 ml, 0,6 mmol). Směs se míchá 15 minut při -15 °C a přidá se na -15 °C ochlazený roztok H—Trp—Lys(Boc)—
—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—
—NHCH₂CH₂S—Trt (0,670 g, 0,5 mmol, připravený podle USA patentu č. 3 917 581, z 4. XI. 1975) a N-ethyl-diisopropylaminu (0,214 ml, 1,25 mmol) v dimethylformamidu (10 ml). Reakční směs se míchá jednu hodinu při -15 °C a 20 hodin při 25 °C a odpaří se pak za sníženého tlaku. Odparek se rozmělní ledem ochlazeným roztokem 1 N kyseliny citrónové, odfiltruje se, promyje se vodou a vysuší nad kysličníkem fosforečným. Pevný podíl se rozmělní se studeným methanolem a vysušením se získá sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 1,99, Asp, 1,15, Thr, 1,73, Ser, 0,67, Phe, 3,00.

Příklad 39

Cyklický disulfid 3-thiopropionyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-lysyl-threonyl-fenylalanyl-threonyl-seryl-2-thioethylamid, I, R¹ a R² = H
[SCH₂CH₂CO—Lys—Asn—Phe—Phe—Trp—
|
—Lys—Thr—Phe—Thr—Ser—NHCH₂CH₂S]

Roztok Trt—SCH₂CH₂CO—Lys(Boc)—
—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—
—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—
—NHCH₂CH₂S—Trt (0,500 g, 0,216 mmol, popsaný v příkladu 38) v kyselině octové (100 ml) se pomalu přidá k míchanému roztoku jódu (0,547 g, 2,16 mmol) v methanolu, (110 ml) při teplotě 25 °C. Po skončení přidávání se roztok míchá jednu hodinu při 25 °C. Roztok se ochladí na 0 °C a pomalým přidáváním 1 N roztoku thiosíranu sodného ve vodě se rozloží přebytek jódu (bezbarvý roztok). Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a odparek se rozmělní s vodou. Sraženina se

odfiltruje, několikrát promyje vodou a vysuší se nad kysličníkem fosforečným. Získá se cyklický chráněný deka-peptid vzorce III.

SCH₂CH₂CO—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—
|

—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—
|

—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHCH₂CH₂S.

(III)

Posledně jmenovaný cyklický deka-peptid se intenzívně míchá při 0 °C v atmosféře dusíku 10 minut v koncentrované kyselině chlorovodíkové (18 ml). Kyselina octová (200 ml) se pak přidá a roztok se ihned lyofilisuje. Odparek se rozpustí ve vrchní fázi směsi rozpouštědel butanol—kyselina octová—voda (4 : 1 : 5) a nanese se na kolonu chemicky modifikovaného síťovaného dextranu (Sephadex G—25 M), připraveného ve spodní fázi systému rozpouštědel. Vrchní fáze výše uvedeného systému rozpouštědel se použije pro desorpci deka-peptidu. Frakce obsahující čistý produkt se spojí a odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí v 5% kyselině octové a lyofilisací se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě soli s kyselinou octovou. UV (methanol) λ_{max} 290 (ε 4920), 282 nm (ε 5390).

Posledně jmenovaná sloučenina ve formě soli s kyselinou octovou se podrobí opakované lyofilisaci z vody a získá se sloučenina uvedená v nadpisu ve formě volné báze. Analýza aminokyselin: Lys, 1,97, Asp, 1,00, Thr, 1,64, Ser, 0,65, Phe, 2,94.

Příklad 40

α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxykarbonyl-tryptofyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-S-trityl-cystein-methylester [Ddz—Trp—Lys(Boc)—
—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—
—Cys(Trt)—OMe]

Roztok diazomethanu v etheru se přidá k roztoku Ddz—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—
—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—
—OH [12,6 g, 0,785 mmol, popsanému H. U. Immer aj., Helv. Chim. Acta, 57, 730 (1974)] v methanolu (10 ml), při teplotě 0 °C. Směs se míchá jednu hodinu při 0 °C a odpaří se. Odparek se podrobí chromatografii na silikagelu použitím 3 % methanolu a 0,5 % pyridinu v chloroformu pro eluci. Odpařením eluátu se získá sloučenina uvedená v nadpisu NMR (CDCl₃), δ 1,13 (s, 18 H), 1,27 (s, 9 H), 1,48 (s, 9 H), 1,77 (s, 6 H), 3,68 (s, 3 H), 3,79 (s, 6 H), 7,1—7,6 (m, 23 H).

Analogickým způsobem za použití diazoethanu, 1-diazopropanu, 2-diazopropanu,

1-diazobutanu, 1-diazoisobutanu, 1-diazopentanu, 4-diazo-2-methylbutanu, 1-diazo-hexanu, 1-diazoheptanu nebo 1-diazo-oktanu místo diazomethanu, se získají odpovídající ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, n-pentyl, 2-methylbutyl, n-hexyl, n-heptyl, n-oktylestery sloučeniny uvedené v nadpisu.

Příklad 41

Decylester S-tritylcysteinu [H—Cys(Trt)—OCH₂(CH₂)₈CH₃]

Roztok hydrochloridu decylesteru cysteinu [0,894 g, 3 mmol, připravený postupem podle Voullie et al., francouzský dodatkový patent, 75, 157 (1961), C. A. 57, 15235c], trifenylkarbinolu (0,78 g, 3 mmol) a bor-trifluoridetherátu (0,42 ml) v kyselině octové (5,2 ml) se míchá jednu hodinu při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a odparek se chromatografuje na silikagelu použitím 40% ethylacetátu v hexanu obsahujícím 0,1 % triethylaminu jako elučního činidla. Odpařením eluátu se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě oleje. $[\alpha]_D^{25} = +25,84^\circ$ (c = 1, CHCl₃), NMR (CDCl₃) δ 0,89 (t, J = 5 Hz, 3 H), 1,3 (s, 16 H), 1,55 (m, 2 H), 2,55 (m, 2 H), 3,25 (2 d, J = 5 Hz), 4,1 (t, J = 6 Hz, 2 H).

Stejným způsobem, ale náhradou výchozího materiálu za ekvivalentní množství hydrochloridu tetradecylesteru cysteinu (připravený podle Voullie aj., citace výše) se získá S-tritylcysteintetradecylester, $[\alpha]_D^{25} = +13,8^\circ$ (c = 1, CHCl₃), NMR (CDCl₃) δ 0,89 (t, J = 5 Hz, 3 H), 1,3 (s, 24 H), 1,56 (m, 2 H), 2,55 (m, 2 H), 3,25 (2 d, J = 5 Hz, 1 H), 4,1 (t, J = 6 Hz, 2 H).

Analogickým způsobem se získají nonyl, undecyl, dodecyl, a tridecylestery S-tritylcysteinu.

Reakcí těchto esterů S-tritylcysteinu s hydrazidem hexapeptidu vzorce

Ddz—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—NHNH₂

azidovým způsobem se získají nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, tridecyl a tetradecylestery odpovídající sloučeniny uvedené v nadpisu příkladu 40.

Příklad 42

Formiát tryptofyl-N^c-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-S-tritylcysteinmethylesteru V, R² = COOCH₃ [H—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OMe . HCO₂H]

Roztok Ddz—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OMe (1,11 g, 0,685 mmol, popsáný v pří-

kladu 40) v 10 ml směsi kyseliny mravenčí—kyseliny octové—vody (1 : 7 : 2) se míchá přes noc při teplotě místnosti. Směs se odpaří a odparek se rozmělní s vodou. Pevný podíl se odfiltruje, vysuší za sníženého tlaku a získá se sloučenin uvedená

MeOH

v nadpisu, λ 290 (ϵ 6,335), 280 (ϵ max

8,470), 273 (3,720), 216 nm (ϵ 78,400).

Analogickým způsobem za použití ostatních heptapeptidů popsaných v příkladech 40 a 41 jako výchozích materiálů se získají ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, n-pentyl, 2-methylbutyl, n-hexyl, n-heptyl, n-oktylester, n-nonyl, n-decyl, n-undecyl, n-dodecyl, n-tridecyl, a n-tetradecylestery odpovídající sloučeniny uvedené v nadpisu.

Příklad 43

t-Butyloxykarbonyl-alanyl-glycyl-S-tritylcysteinyl-N^c-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginyl-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^c-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-S-tritylcysteinmethylester, II, R² = COOCH₃ a R⁴ = Boc—Ala—Gly—NH—[Boc—Ala—Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OMe]

K roztoku prvního hydrazidu heptapeptidu (IV) Boc—Ala—Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—NHNH₂, (0,755 g, 0,624 mmol, popsanému v práci H. U. Immer aj., citace výše) v dimethylformamidu (9 ml) se při -20 °C přidá 2,1 N roztok bezvodého chlorovodíku v ethylacetátu (1,56 mmol) a pak se přidá terc.-butylnitrit (0,0863 ml, 0,749 mmol). Roztok se míchá 15 minut při -15 °C. K tomuto roztoku se při teplotě -15 °C přidá roztok druhého methylesteru heptapeptidu V, H—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OMe .

HCO₂H (0,900 g, 0,624 mmol, popsaného v příkladu 42) a N-ethyl-diisopropylaminu (0,373 ml, 2,184 mmol) v dimethylformamidu (5 ml), ochlazený na -15 °C. Vzniklá směs se míchá při -15 °C jednu hodinu a pak tři dny při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozmělní s 1 N kyselinou citrónovou, filtruje se a sraženina se promyje vodou a vysuší nad kysličníkem fosforečným za sníženého tlaku. Vysušený zbytek se rozmělní s malým množstvím methanolu a zbytek se jímá a vysušením se získá sloučenina uvedená v nadpisu. Analýza aminokyselin: Lys, 2,06, cysteová kyselina 1,75, Asp, 0,94, Thr, 1,93, Ser, 0,97, Gly, 1,00, Ala, 0,88, Phe, 3,10.

Stejným způsobem za použití ostatních

alkylesterů heptapeptidu vzorce V, popsáných v příkladu 42, se také získají odpovídající ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, n-pentyl, 2-methylbutyl, n-hexyl, n-heptyl, n-oktyl, n-nonyl, n-decyl, n-undecyl, n-dodecyl, n-tridecyl a n-tetradecylestery sloučeniny uvedené v nadpise.

Příklad 44

Cyklický disulfid t-butyloxykarbonyl-alanyl-glycyl-cysteinyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-N^e-t-butyloxykarbonyl-lysyl-O-t-butyl-threonyl-fenylalanyl-O-t-butyl-threonyl-O-t-butyl-seryl-cysteinmethylester, III, R² = COOCH₃ a R⁴ Boc-Ala-Gly-NH [Boc-Ala-Gly-Cys-Lys(Boc)]-

—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—

—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys—OMe]

Lineární chráněný methylester tetradekapeptidu z příkladu 43, Boc-Ala-Gly—Cys(Trt)—Lys(Boc)—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—Cys(Trt)—OMe (0,898 g, 0,345 mmol) se rozpustí v horké kyselině octové (200 ml). Roztok se ochladí na teplotu místnosti a během jedné hodiny se přikape k roztoku 5 % jódu v methanolu (175 ml, 3,45 mmol). Směs se další hodinu míchá, ochladí se na 0 °C a po odstranění přebytku jódu se přidá 1 N roztok thiosíranu sodného ve vodě (15 ml). Rozpouštědlo se odpaří, odparek se rozmělní s vodou a vysuší se nad kyslíčným fosforečným za sníženého tlaku a získá se sloučenina uvedená v nadpisu. Stejným způsobem, za použití ostatních lineárních chráněných esterů tetradekapeptidu vzorce II, popsáných v příkladu 43, se také připraví odpovídající ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, n-pentyl, 2-methylbutyl, n-hexyl, n-heptyl, n-oktyl, n-nonyl, n-decyl, n-undecyl, n-dodecyl, n-tridecyl a n-tetradecylestery sloučeniny uvedené v nadpisu.

Příklad 45

Somatostatinmethylester, cyklický disulfid alanyl-glycyl-cysteinyl-lysyl-asparaginy-fenylalanyl-fenylalanyl-tryptofyl-lysyl-threonyl-fenylalanyl-threonyl-seryl-cystein-

methylester, I, R¹ = H—Ala—Gly—NH a R² = COOCH₃ (H—Ala—Gly—Cys—Lys—

—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys—Thr—Phe—

—Thr—Ser—Cys—OMe]

Roztok cyklického disulfidu podle příkladu 44, Boc-Ala-Gly—Cys—Lys(Boc)—

—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys(Boc)—

—Thr(Bu⁺)—Phe—Thr(Bu⁺)—Ser(Bu⁺)—

—Cys—OMe, (0,345 mmol) v koncentrované kyselině chlorovodíkové (29 ml) se míchá 10 minut v atmosféře dusíku při 0 °C. Přidá se ledová kyselina octová (290 ml) a roztok se lyofilisuje. Odparek se rozpustí v 0,2 M roztoku octanu amonného, nanese se na kolonu karboxymethylcelulózy (Whatman CM-23) a eluuje se 0,2 M puforem octanu amonného. Eluát se lyofilisuje. Odparek se chromatografuje na koloně chemicky modifikovaného síťovaného dextranu (Sephadex G-25 M) ekvilibrovaného ve spodní fázi směsí n-butanol—kyselina octová—voda (4 : 1 : 5) a pak se ekvilibruje ve vrchní fázi. Pro desorpci methylesteru somatostatinu se použije vrchní fáze. Čistě frakce se spojí, odpaří a lyofilisací se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve for-

MeOH
mě soli s kyselinou octovou. λ 290
max

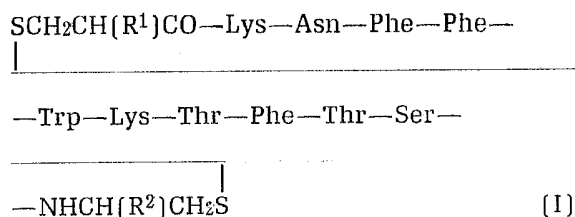
(ε 4,345), 287 (ε 4,385), 268 (ε 4,090), 265 (ε 3,900), 215 nm (ε 38,305), alkalická hydrolýza a plynová chromatografie vypočteno pro methanol 1,75 %, nalezeno 2,0 %, NMR (DMSO-d₆) δ 3,63 (s, 3 H, OCH₃).

Opakovanou lyofilisací poslední soli s kyselinou z vody se získá sloučenina uvedená v nadpisu ve formě volné báze: Analýza aminokyselin Lys, 2,00, cysteová kyselina, 1,28, Asp, 0,95, Thr, 1,91, Ser, 0,97, Gly, 1,00, Ala, 0,94, 1/2 Cys, 0,30, Phe, 3,01.

Stejným způsobem, ale použitím ostatních cyklických disulfidů vzorce III popsáných v příkladu 44 se připraví odpovídající ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, n-pentyl, 2-methylbutyl, n-hexyl, n-heptyl, n-oktyl, n-nonyl, n-decyl, n-undecyl, n-dodecyl, n-tridecyl a n-tetradecylestery sloučeniny uvedené v nadpisu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby tetradeka-peptidu obecného vzorce I,

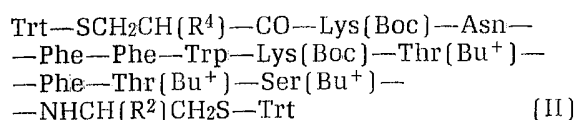


kde

a) R^1 je $\text{H}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$, $\text{H}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ nebo $\text{H}-\text{Leu}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ a R^2 je H nebo COOH , nebo

b) R^1 je H nebo NHR^3 , kde R^3 je acylový zbytek nerozvětvené nebo rozvětvené alifatické karboxylové kyseliny s 1 až 6 atomy uhlíku nebo benzoyl a R^2 je H , nebo

c) R^1 je $\text{H}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ a R^2 je COOalk , kde alk je alkyl s nerozvětveným nebo rozvětveným řetězcem s 1 až 14 atomy uhlíku, vyznačený tím, že se oxiduje lineární peptid obecného vzorce II,



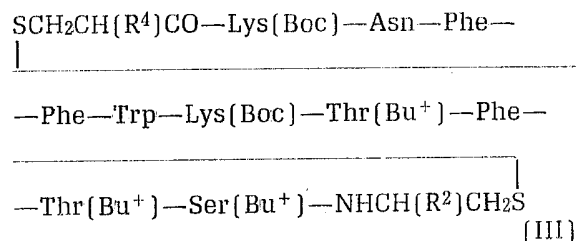
kde

a) R^2 je H nebo COOH a R^4 je $\text{Boc}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$, $\text{Boc}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ nebo

$\text{Boc}-\text{Leu}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ nebo

b) R^2 je H a R^4 je H nebo NHR^3 , kde R^3 má význam uvedený výše, nebo

c) R^2 je COOalk a R^4 je $\text{Boc}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$, jódem nebo rhodanem za vzniku odpovídajícího cyklického disulfidového derivátu obecného vzorce III,



kde

R^2 a R^4 mají význam uvedený výše, a pak se odstraní zbylé chránicí skupiny reakcí s 50 až 100% kyselinou trifluoroctovou nebo roztokem minerální kyseliny.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se roztok lineárního peptidu vzorce II v kyselině octové nechá reagovat s jódem v roztoku v alkanolu s 1 až 4 atomy uhlí-

ku nebo v kyselině octové a vzniklý cyklický disulfid vzorce III se nechá reagovat s kyselinou chlorovodíkovou a odpovídající peptid vzorce I se isoluje.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se lineární peptid vzorce II nechá reagovat s jódem při teplotě 0° až 30°C po dobu 30 až 180 minut v alkanolu s 1 až 4 atomy uhlíku nebo v kyselině octové a získá se odpovídající cyklický disulfid vzorce III.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se cyklický disulfid vzorce III nechá reagovat s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou při teplotě 0°C po dobu pěti až deseti minut a získá se odpovídající peptid vzorce I.

5. Způsob podle bodu 1, pro přípravu tetradeka-peptidu obecného vzorce I, uvedeného v bodě 1, kde R^1 je $\text{H}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$, $\text{H}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ nebo $\text{H}-\text{Leu}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ a R^2 je H nebo COOH , vyznačený tím, že se oxiduje lineární peptid obecného vzorce II, uvedeného v bodě 1, kde R^2 má výše uvedený význam a R^4 má význam uvedený v bodě 1, jódem nebo rhodanem za vzniku odpovídajícího cyklického disulfidového derivátu obecného vzorce III, uvedeného v bodě 1, kde R^2 má výše uvedený význam a R^4 má význam uvedený v bodě 1, a pak se odstraní zbylé chránicí skupiny reakcí s 50 až 100% kyselinou trifluoroctovou nebo roztokem minerální kyseliny.

6. Způsob podle bodu 1 pro přípravu tetradeka-peptidu obecného vzorce I, uvedeného v bodě 1, kde R^1 je H nebo NHR^3 , kde R^3 je acylový zbytek nerozvětvené nebo rozvětvené alifatické karboxylové kyseliny s 1 až 6 atomy uhlíku nebo benzoyl a R^2 je H , vyznačený tím, že se oxiduje lineární peptid obecného vzorce II, uvedeného v bodě 1, kde R^2 má výše uvedený význam a R^4 má význam uvedený v bodě 1, jódem nebo rhodanem za vzniku odpovídajícího cyklického disulfidového derivátu obecného vzorce III, uvedeného v bodě 1, kde R^2 má výše uvedený význam a R^4 má význam uvedený v bodě 1, a pak se odstraní zbylé chránicí skupiny reakcí s 50 až 100% kyselinou trifluoroctovou nebo roztokem minerální kyseliny.

7. Způsob podle bodu 1, pro přípravu tetradeka-peptidu obecného vzorce I, uvedeného v bodě 1, kde R^1 je $\text{H}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}$ a R^2 je COOalk , kde alk je alkyl s nerozvětveným nebo rozvětveným řetězcem s 1 až 14 atomy uhlíku, vyznačený tím, že se oxiduje lineární peptid obecného vzorce II, uvedeného v bodě 1, kde R^2 má výše uvedený význam a R^4 má význam uvedený v bodě 1, jódem nebo rhodanem za vzniku odpovídajícího cyklického disulfidového de-

rivátu obecného vzorce III, uvedeného v bodě 1, kde R^2 má výše uvedený význam a R^4 má význam uvedený v bodě 1, a pak se

odstraní zbylé chránicí skupiny reakcí s 50 až 100 % kyselinou trifluoroctovou nebo roztokem minerální kyseliny.