

2 10 1970
PRL

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

59518

Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 11.XI.1966 (P 117 316)

Pierwszeństwo: 12.XI.1965 Szwajcaria

Opublikowano: 25.III.1970

Kl. 12 q, 6/01

MKP C 07 c 103/52

CZYTELNICIA

UKP
Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Właściciel patentu: CIBA Société Anonyme, Bazylea (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania nowych peptydów o działaniu ACTH

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania peptydu D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-metionylo-L-glutamylo-L-histydylo-L-feniloalanylo-L-agrinylo-L-tryptofanylo-glicylo-L-lizylo-L-prolilo-L-waliloglicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-proliny jak też peptydu, który zamiast reszty glutamylowej zawiera resztę glutaminy, oraz ich soli addycyjnych z kwasami, pochodnych i związków kompleksowych.

Z belgijskiego opisu patentowego Nr 668250 znany jest sposób otrzymywania peptydów, które odznaczają się wzmocnionym działaniem adrenokortikotropowym i które różnią się od znanych peptydów o działaniu ACTH tym, że na końcu aminy jako pierwszy α -aminokwas zawierają D-aminokwas.

Jako peptyd o bardzo dobrym działaniu adrenokortikotropowym opisany jest w belgijskim opisie patentowym nr 668250 H-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gly-Liz-Pro-Val-Gly-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-Val-Liz-Val-Tyr-Pro-OH (D-Ser¹- β^{1-24} -kortikotropina).

Stwierdzono, że odpowiedni peptyd, który zamiast reszt argininy w pozycji 17, 18 zawiera resztę lizyny wykazuje podobne działanie adrenokortikotropowe. Nowy peptyd D-Ser¹, Lys^{17, 18}- β^{1-24} -kortikotropina jest łatwiejszy do otrzymania aniżeli D-Ser¹- β^{1-24} -kortikotropina, ponieważ nie za-

2

wiera w pozycji 17, 18 reszt argininy, które utrudniają wytworzenie peptydu ze względu na resztę guanidynową w łańcuchu bocznym.

Otrzymany sposobem według wynalazku polipeptyd można następnie przeprowadzać w sole addycyjne z kwasami, w pochodne takie jak estry, hydrazydy, amidy jak też w związki kompleksowe.

Jako sole addycyjne z kwasami wymienia się zwłaszcza sole z kwasami dającymi się stosować w terapii, jak kwas solny, kwas octowy, przede wszystkim jednak sole trudnorozpuszczalne jak siarczany, fosforany lub sulfoniany.

Jako pochodne należy rozumieć na przykład estry, jak niższe estry alkilowe na przykład, metylowy, etylowy, propylowy, III-rzęd.-butylowy niepodstawione lub podstawione na przykład grupą nitrową, chlorowcem, niższą grupą alkilową lub alkoksylową estry benzylowe, dalej hydrazydy i amidy, zwłaszcza amidy peptydów, w których zamidowana jest końcowa grupa karboksylowa.

Jako związki kompleksowe należy rozumieć takie związki, które powstają przez traktowanie peptydów związkami organicznymi lub nieorganicznymi, powodującymi przedłużenie ich działania. Struktura tych związków nie została jeszcze wyjaśniona. Takimi substancjami nieorganicznymi są związki wywodzące się z metali jak wapń, magnez, glin, kobalt a zwłaszcza cynk, przede wszystkim trudnorozpuszczalne sole jak fosforany i pirofosforany jak też wodorotlenki tych metali.

Organicznymi substancjami powodującymi przedłużenie działania są na przykład nie antygenna żelatyna na przykład oksypoliżelatyna, poliwinylolopirolidon i karboksymetyloceluloza, poza tym estry kwasów sulfonowego i fosforowego z kwasem alginowym, dekstryną, polifenolami i polialkoholami, przede wszystkim fosforan polifloretyny i kwasu fitynowego jak też polimery i kopolimery aminokwasów na przykład protaminy a zwłaszcza aminokwasów, które wykazują przeważający udział kwaśnych α -aminokwasów jak kwas glutaminowy lub asparaginowy.

Nowe związki wykazują, jak już wspomniano, znacznie zwiększoną aktywność adrenokortykotropową, aniżeli odpowiednie związki z konfiguracją L przy pierwszym aminokwasie. Należy je odpowiednio do tego stosować w medycynie i weterynarii na przykład zamiast naturalnego hormonu.

Nowe peptydy otrzymuje się w znany sposób przy zastosowaniu D-aminokwasu jako N-końcowego aminokwasu. Aminokwasy łączy się przy tym pojedynczo według wymienionej kolejności, albo po uprzednim utworzeniu peptydów o mniejszych cząsteczkach. Po przeprowadzonej syntezie odszczepia się grupy ochronne jednostopniowo lub ewentualnie w kilku stopniach.

Sposób według wynalazku polega na tym, że z D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-metionylo-L-glutamyl-L-histydyl-L-fenylalanylo-L-**agrynylo-L-tryptofylo-glicylo-L-lizylo-L-propylo-L-walilo-glicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-propylo-L-walilo-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-proliny** albo odpowiedniego związku zawierającego zamiast reszty glutamylowej resztę glutaminy, w których to peptydach chronione są co najmniej grupa α -aminowa i grupy aminowe w łańcuchach bocznych jak też końcowa grupa karboksylowa i ewentualnie obecna grupa karboksylowa w łańcuchu bocznym, odszczepia się grupy ochronne i ewentualnie otrzymane związki przeprowadza się w ich sole addycyjne z kwasami, w inne pochodne lub związki kompleksowe. Połączenia aminokwasów i/lub jednostek peptydów następuje w ten sposób, że aminokwas lub peptyd z chronioną grupą α -aminową i z aktywowaną końcową grupą karboksylową poddaje się reakcji z aminokwasem lub peptydem z wolną grupą α -aminową i z wolną lub chronioną na przykład zestryfikowaną lub zamidowaną końcową grupą karboksylową lub aminokwas albo peptyd z aktywowaną grupą α -aminową i chronioną końcową grupą karboksylową poddaje się reakcji z aminokwasem lub peptydem z wolną końcową grupą karboksylową i z chronioną grupą α -aminową.

Grupę karboksylową można aktywować na przykład przez przeprowadzenie w halogenek kwasowy, azydek, bezwodnik, imidazolid, izoksazolid lub w aktywowany ester jak ester cyjanometylowy, karboksymetylowy, p-nitrofenylowy lub przez reakcję za pomocą karbodwuimidu (ewentualnie z dodatkiem imidu kwasu N-hydroksybursztynowego) lub N,N'-karbonylo-dwuimidoazolu, zaś grupę aminową można aktywować na przykład przez reakcję z fosfatoamidem. Jako najbardziej użytecz-

ne metody wymienia się metodę karbodwuimidową, azydową, metodę aktywowanych estrów i metodę bezwodnikową. Podkreślić należy również tak zwaną syntezę z nośnikiem stałym, w której peptyd rozbudowuje się od końca grupy karboksylowej, związanej estrowo z polimerem, przez kolejną kondensację aminokwasów.

Nie biorące udziału w reakcji wolne grupy funkcjonalne chroni się korzystnie za pomocą reszt dających się łatwo odszczepić na drodze hydrolizy lub redukcji, i tak grupy karboksylowe korzystnie przez zestryfikowanie na przykład metanolem, III-rzęd. butanolem, alkoholem benzylovym, alkoholem p-nitrobenzylovym lub przez utworzenie amidu, grupy aminowe na przykład przez wprowadzenie grupy toluenosulfonylowej, trójfenylo-metylowej, formylowej, trójfлуoroacetylowej, O-nitrofenylosulfonylowej, ftalilowej, grupy karbobenzoksylowej lub barwnych grup ochronnych jak grupy p-fenyl-azo-benzylooksykarbonylowej i grupy p-(p'-metoksyfenyloazo)-benzylooksykarbonylowej lub przede wszystkim reszty III-rzęd. butylooksykarbonylowej. Do ochrony grupy aminowej w ugrupowaniu guanidowym argininy odpowiednia jest grupa nitrowa; wymieniona grupa aminowa argininy nie musi być jednak koniecznie chroniona, podczas reakcji. Grupę iminową histydyny można chronić resztą benzylovą lub trójfenylo-metylową.

Przekształcenie chronionej grupy aminowej lub iminowej w wolną grupę jak też przeprowadzenie funkcjonalnie zmienionej grupy karboksylowej w wolną grupę karboksylową przeprowadza się w trakcie procesu znanymi metodami przez traktowanie środkami powodującymi hydrolizę względnie redukcję.

Korzystny sposób polega na tym, że trójpeptyd H-D-Ser-Tyr-Ser-OH zawierający pierwsze 3 aminokwasy (skrótów odnoszą się do L-aminokwasów, jeżeli D- nie zaznaczono specjalnie) lub cztero-peptyd, który oprócz tego zawiera czwarty aminokwas poddaje się kondensacji z heptapeptydem względnie heksapeptydem następnych aminokwasów aż do 10 aminokwasów, korzystnie metodą azydową a następnie deka-peptyd kondensuje z tetradeka-peptydem aminokwasów 11—24. Przy kondensacji tej jako metodę sprzęgania stosuje się metodę karbodwuimidową lub metodę aktywowanych estrów przede wszystkim za pomocą estru p-nitrofenyloвого.

W ostatnim przypadku nie jest konieczne izolowanie samego estru p-nitrofenylowego deka-peptydu, lecz można go wytworzyć również w trakcie kondensacji z deka-peptydu z wolną grupą karboksylową, p-nitrofenolu i dwucykloheksylokarbodwuimidu. Dekapeptyd występuje więc jako α -amino-chroniony peptyd z wolną grupą karboksylową albo z grupą p-nitrofenyloestrową. Tetradeka-peptyd stosuje się w postaci estru, korzystnie estru III-rzęd. butylowego lub w postaci ω -amidu. Grupy aminowe obecnie w łańcuchach bocznych odcinków peptydu poddawanych kondensacji chroni się za pomocą III-rzęd. grupy butylooksykarbonylowej, a grupy karboksylowe z bocznych łańcuchów za pomocą III-rzęd. grupy butyloestrowej.

Grupy ochronne odszczepia się w ostatnim stopniu za pomocą kwasu trójtłorooctowego.

Dalszy korzystny sposób polega na tym, że tetrapeptyd H-D-Ser-Tyr-Ser-Met-OH zawierający pierwsze 4 aminokwasy kondensuje się z ejkoza-peptydem aminokwasów 5—24. Przy kondensacji jako metodę sprzęgania stosuje się korzystnie metodę azydową. Grupę α -aminową hydrazyny względnie azydu tetrapeptydu chroni się korzystnie za pomocą III-rzęd. grupy butyloksykarbonylowej. Ejkoza-peptyd może występować jako wolny peptyd lub jako ester zwłaszcza ester III-rzęd. butyloxy lub jako pro²⁴-amid. Również w ejkoza-peptydzie chroni się grupy aminowe bocznych łańcuchów korzystnie za pomocą III-rzęd. grupy butylo-oksykarbonylowej, a grupy karboksylowe bocznych łańcuchów za pomocą III-rzęd. butylo-estrowej.

Po otrzymaniu na drodze kondensacji odcinków peptydów tetrakopeptydu, których grupy α -aminowe i grupy aminowe w łańcuchach bocznych chronione są przez III-rzęd. grupę butyloksykarbonylową i których końcowe grupy karboksylowe i grupy karboksylowe w łańcuchach bocznych chronione są przez III-rzęd. butyloxy grupę estrową, można odszczepić równocześnie wszystkie grupy ochronne na drodze hydrolizy kwasowej na przykład kwasem trójtłorooctowym. Jeżeli końcowa grupa karboksylowa nie występuje jako III-rzęd. butyloxy grupa estrowa, lecz jako grupa amidowa, wówczas otrzymuje się amidy peptydów. Hydrazyny peptydów otrzymuje się na przykład przez potraktowanie wodzianem hydrazyny niższych alkiłowych grup estrowych stojących na końcu peptydu.

Wynalazek dotyczy również tych postaci wykonania sposobu, według których wychodzi się ze związku otrzymanego jako produkt pośredni na dowolnym stopniu procesu, po czym przeprowadza się brakujące stopnie procesu, lub proces przerywa się na dowolnym stopniu.

W zależności od sposobu prowadzenia syntezy nowe związki otrzymuje się w postaci zasad lub ich soli. Z soli można otrzymać w znany sposób zasady. Z tych ostatnich można znowu otrzymać sole przez reakcję z kwasami, które prowadzą do uzyskania soli nadających się do terapeutycznego stosowania, na przykład z kwasami nieorganicznymi jak kwasy chlorowcowodorowe, na przykład kwas solny lub bromowodorowy, kwasy nadchlorowy, azotowy lub tiocyjanowy, kwasy siarkowy lub fosforowy lub z kwasami organicznymi jak kwas mrówkowy, octowy, propionowy, glikolowy, mlekowy, pirogonowy, szczawowy, malonowy, bursztynowy, meleinowy, fumarowy, jabłkowy, winowy, cytrynowy, askorbinowy, hydroksymaleinowy, dwuhydroksymaleinowy, benzoowy, fenylloctowy, 4-aminobenzoowy, 4-hydroksybenzoowy, antranilowy, cynamonowy, migdałowy, salicylowy, 4-aminosalicylowy, 2-fenoksybenzoowy, 2-acetoksybenzoowy, metanosulfonowy, etanosulfonowy, hydroksyetanosulfonowy, benzenosulfonowy, p-toluenosulfonowy, naftalenosulfonowy, lub sulfanilowy.

Peptydy otrzymane sposobem według wynalazku mogą znaleźć zastosowanie jako leki w postaci preparatów farmaceutycznych. Preparaty te zawierają peptydy w mieszaninie z farmaceutycznym, organicznym lub nieorganicznym nośnikiem nadającym się do stosowania doustnego jak też pozajelitowego. Jako nośniki brane są pod uwagę substancje, które nie reagują z peptydami jak na przykład żelatyna, cukier mlekowy, glukoza, sól kuchenna, skrobia, stearynian magnezu, talk, oleje roślinne, alkohole benzyłowe, guma, poliglikole alkiłowe, wazelina, cholesteryna lub inne znane nośniki. Preparaty farmaceutyczne mogą występować na przykład w postaci ciekłej, jako roztwory, zawiesiny lub emulsje. Ewentualnie są one sterylizowane i/lub zawierają substancje pomocnicze jak środki konserwujące, stabilizujące, zwilżające lub emulgujące. Mogą one również zawierać inne terapeutycznie wartościowe składniki.

Nowe związki, tak jak naturalne ACTH można również podawać w postaci preparatu o przedłużonym działaniu, na przykład z oksypoliżelatyną, fosforanem polifloretyny, karboksymetylocelulozą albo z wyżej wymienionymi trudno rozpuszczalnymi związkami metali zwłaszcza fosforanami, pirofosforanami lub wodorotlenkiem cynku.

Poza tym w celu przedłużenia działania nowych peptydów można przeprowadzić je w kompleksy z polimerami lub kopolimerami aminokwasów, zwłaszcza tych, które zawierają przeważającą ilość kwaśnych grup α -aminokwasowych jak kwas glutaminowy lub asparaginowy o konfiguracji L-, D- lub D,L-. Wymienione polimery lub kopolimery posiadają w bocznych łańcuchach wolne grupy karboksylowe, podczas gdy końcowa grupa karboksylowa jest wolna lub przekształcona pod względem funkcjonalnym i może występować na przykład jako grupa estrowa lub jako grupa amidowa niepodstawiona, lub podstawiona resztami węglowodorowymi, przede wszystkim niższymi grupami alkiłowymi. Ciężar cząsteczkowy polimerów może wynosić 1000—100000, korzystnie wynosi 2000—15000. Do wytwarzania preparatów stosuje się korzystnie rozpuszczalną w wodzie sól, dopuszczalną fizjologicznie, na przykład sól sodową lub amonową albo sól z organiczną zasadą jak trójtetyloamina, prokaina, dwubenzylamina lub z innymi trzeciorzędowymi zasadami zawierającymi azot.

Polimery są znane albo można je wytwarzać znanymi metodami na przykład według sposobu opisanego przez M. Idelson'a i innych w J. Am. Chem. Soc. 80, 4631 et seq. (1958). Tak na przykład ester: kwas glutaminowy- α -karboksy-bezwodnik- γ -benzyłowy lub -III-rzęd.-butyloxy w dioksanie poddaje się reakcji z amoniakiem lub z aminą w określonym stosunku molowym na przykład 100:1 (w zależności od pożądanego stopnia polimeryzacji), a po skończonej polimeryzacji odszczepia grupy ochronne na przykład grupę benzyloksyloxy bromowodorem w lodowatym kwasie octowym, a grupę III-rzęd. butyloksyloxy kwasem trójtłorooctowym. W celu wytworzenia polimerów o jednolitej, określonej długości łańcucha

można wytwarzać je na drodze syntezy metodami przyjętymi w chemii peptydów (metoda karbo-dwuimidowa, metoda azydowa i tak dalej).

Stężenie polimerów w preparatach farmaceutycznych zależy od rozpuszczalności danej soli i od lepkości. Polimer winien występować w postaci rozpuszczonej i nadającej się do iniekcji.

Stężenie peptydu czynnego adrenokortikotropowo dobiera się tak, ażeby preparat wykazywał na przykład 10–50 I.E./1 ml.

Sposób według wynalazku objaśnia poniższy przykład. Temperatury podane są w stopniach Celsjusza.

Układy chromatogramów cienkowarstwowych oznaczono następująco:

Układ 43A: III-rzęd. alkohol amyłowy-izopropanol-woda (100:40:10)

Układ 45: III-rzęd. butanol-3% wodny roztwór amoniaku (100:44)

Układ 100: octan etylu-pirydyna-kwas octowy lodowaty-woda (62:21:6:11)

Układ 101: n-butanol-pirydyna-kwas octowy lodowaty-woda (30:20:6:24)

Stosuje się następujące skróty:

Z = grupa karbobenzoksylowa

BOC = grupa III-rzęd. butylooksykarbonylowa

tBu = grupa III-rzęd. butylowa

Przykład. Z.Liz/BOC/-Liz/BOC/.NHNH₂

1) 10 g Z.Liz/BOC/-Liz/BOC/OCH₃ (wytworzone z Z.Liz/BOC/-OH + H.Liz/BOC/-OCH₃, metodą dwucykloheksylokarbodwuimidu) rozpuszcza się w 100 ml metanolu i traktuje 7,8 ml wodzianu hydrazyny.

Klarowny roztwór pozostawia się do odstania na 24 godziny w temperaturze 25° a następnie zagęszcza do około 1/3 pierwotnej objętości. Po dodaniu 200 cm wody wytrąca się oleisty osad, który podczas ochładzania i rozcierania zestala się i może być sproszkowany. Odsącza się na nucz, przemywa wodą i surowy produkt suszy. Oczyszcza się go przez jednorazowe przekrystalizowanie z metanolu-lodowatego kwasu octowego eteru naftowego.

Temperatura topnienia 118–119,5°. Na cienkowarstwowych płytach z silikażelu otrzymuje się następujące wartości R_f:

R_f (43A) = 0,40

R_f (chloroform-metanol = 9:1) = 0,75

2) Z.Liz/BOC/-Liz/BOC/-Pro-OH

1,87 g Z.Liz/BOC/-Liz/BOC/.NHNH₂ rozpuszcza się w 15 ml świeżo przedestylowanego dwumetyloformamidu i chłodzi do –25°. Następnie wkrapla się powoli 2,07 ml 4,35 n kwasu solnego i 0,66 ml 5 n roztworu azotynu sodu. Miesza się w ciągu 10 minut w temperaturze –10° i dodaje roztwór 692 mg L-proliny w 4,2 ml dwumetyloformamidu i wody (2:1). Następnie w temperaturze –10° dodaje się 1,82 ml trójetylaminy i pozostawia przez noc w temperaturze 0° i w czasie dalszych dwóch godzin w temperaturze pokojowej.

Następnie zagęszcza się w wysokiej próżni do objętości około 4 ml, a kleistą pozostałość traktuje 25 ml wody, którą przez schłodzenie do temperatury 0° i roztarcia można proszkować. Odsącza się na nucz, przemywa małą ilością wody i suszy w wysokiej próżni w temperaturze 40°.

W celu oczyszczenia nie krystalizującego surowego produktu przeprowadza się wielokrotnie rozdział metodą Craig'a w układzie rozpuszczalników metanol-bufor-chloroform-czterochlorek węgla (35:13:15:15) bufor = 28,5 ml lodowatego kwasu octowego + 19,25 g octanu amonu w 960 ml wody, stosując objętość faz po 10 ml. Po 220 stopniach z elementów rozdziału nr 49–73 ($\mu_{\max}$ = 61; K = 0,39) wydziela się przez zagęszczenie do sucha i odsublimumowanie octanu amonu chromatograficznie czystą, jednak bezpostaciową pochodną trójetylaminy o temperaturze topnienia około 70–80°. Na chromatogramie cienkowarstwowym na silikażelu otrzymuje się następujące wartości R_f:

R_f (chloroform-metanol = 9:1) = 0,19

R_f (43A) = 0,29

R_f (45) = 0,52

3) Z.Liz/BOC/-Liz₂BOC/-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-Pro.OtBu 2,4 g Z.Liz/BOC/-Liz/BOC/-Pro.OH i 3,12 g H.Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-Pro.OtBu rozpuszcza się w 30 ml absolutnego chloroformu.

W temperaturze 0° dodaje się 0,845 g dwucykloheksylokarbodwuimidu, miesza w czasie 1 godziny w temperaturze 0° i następnie odstawia na 30 godzin w temperaturze 25°. Wydzielone kryształy dwucykloheksylomocznika odsącza się i przemywa małą ilością lodowatego kwasu octowego. Do przesącza dodaje się 150 ml estru etylowego i ekstrahuje fazą organiczną w temperaturze 0°, trzykrotnie stosując po 30 ml 3% roztworu kwasu winowego w celu usunięcia nadmiaru pentapeptydu. Przemywa się jeszcze kilkakrotnie wodą aż do obojętnego odczynu i odparowuje do sucha. W celu oddzielenia zanieczyszczeń lipofilowych rozpuszcza się pozostałość w 10 ml metanolu i 20 ml octanu etylu i wytrąca oktapeptyd przez dodanie 120 ml eteru naftowego w postaci masy o konsystencji smaru, którą suszy się w próżni w temperaturze 40°. Tak otrzymany surowy produkt (3,1 g) w celu ostatecznego oczyszczenia podaje się rozdziałowi według Craig'a w układzie metanol - bufor - chloroform - czterochlorek węgla (30:10:3:30) — [bufor jak podano pod 2)] w 225 stopniach przy objętości faz po 10 ml. Po zagęszczeniu zawartości elementów Nr 65–96 ($\mu_{\max}$ = 78; K = 9,53) do sucha i odsublimumowaniu octanu amonowego w wysokiej próżni, otrzymuje się chromatograficznie jednorodną pochodną oktapeptydu w postaci białego bezpostaciowego proszku o temperaturze topnienia około 130–140°. Wykazuje on na silikażelu wartość R_f:

R_f (43A) = 0,74

R_f (chloroform-metanol = 9:1) = 0,54

R_f (Benzen-aceton = 1:1) = 0,33

4) H.Liz/BOC/-Liz/BOC/-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-Pro.OtBu 1,46 g Z.Liz/BOC/-Liz/BOC/-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-Pro.OtBu w 40 ml meta-

nolu uwodarnia się po dodaniu 300 mg 10% pal-
ladu osadzonego na węglu w wstrząsarce, przy
absorpcji CO₂. Pobieranie wodoru ukończone jest
już po 20 minutach. Po 1 godzinie odsąca się
katalizator, przemywa metanolem i przesąca od-
parowuje do sucha. Otrzymuje się z wydajnością
ilościową chromatograficznie jednorodną dekarbo-
benzoksylową pochodną oktapeptydu w postaci
białego bezpostaciowego proszku o temperaturze
topnienia 110—120°. Wykazuje on na cienkowar-
stwowym chromatogramie na silikażelu warto-
ści Rf:

Rf (43A) = 0,53
Rf (chloroform-metanol = 9:1) = 0,34

5) Z.Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-
-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-
-Pro-OtBu.

1,98 g Z.Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/
NHNH₂/G.No 2209/63 Case 5247/5123/ rozpuszcza
się w 22 ml absolutnego dwumetyloformamidu
i po ochłodzeniu do temperatury -25° wkrapla
mieszając 3,4 ml 2,115 n kwasu solnego, a następ-
nie traktuje 0,378 ml 5 n roztworu azotynu sodo-
wego. Klarowny roztwór miesza się dalej przez
15 minut w temperaturze -10°, a następnie trak-
tuje ochłodzonym wstępnie do temperatury -5°
roztworem 1.313 g wyżej opisanej pochodnej okta-
peptydu w 4 ml dwumetyloformamidu. Przemy-
wa się jeszcze 1 ml dwumetyloformamidu, i na-
stępnie wkrapla wolno w temperaturze -5° 1,05
ml trójetyloaminy. Mieszaninę reakcyjną miesza
się jeszcze w ciągu 30 minut, a następnie odsta-
wia na 15 godzin w temperaturze 0°. Następnie
zagęszcza się aż do utworzenia lepkiego oleju
i z tego przez dodanie 20 ml wody wytrąca się
masa o konsystencji smaru. Rozpuszcza się ją po-
nownie w 20 ml metanolu, a peptyd wytrąca
powtórnie przez dodanie 30 ml wody. Przy ochłó-
dzeniu do 0° i roztarciu otrzymuje się proszkową
zawiesinę, którą odsąca się, przemywa wodą
i suszy. Ten surowy produkt w celu oczyszczenia
poddaje się rozdzielowi Craig'a w układzie meta-
nol-bufor-chloroform-czterochlorek węgla (60:20:3:
:50) [bufor jak pod numerem 2)] przy objętości
faz po 20 ml. Po 218 stopniach izoluje się z ele-
mentów nr 105—134 ($\mu_{\max}$ = 121; K = 1,25) przez
zagęszczanie do sucha i odsublimowanie w wy-
sokiej próżni octanu amonu chromatograficznie
jednolity, chroniony tetradekapeptyd w postaci
białego bezpostaciowego proszku o temperaturze
180—190°. Wykazuje on na silikażelu następujące
wartości Rf:

Rf (43A) = 0,80
Rf (chloroform-metanol = 9:1) = 0,49

6) H-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-
-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-
-Pro-OtBu.

1,66 g Z.Liz/BOC-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-
-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Pro-Wal-Liz/BOC/-
-Wal-Tyr-Pro-OtBu rozpuszcza się w 40 ml me-
tanolu i normalnie uwodarnia 300 mg 10% pal-

ladu na węglu (10% Pd). Przy zagęszczaniu, prze-
sączonego roztworu po uwodornieniu, do sucha
otrzymuje się bezpośrednio chromatograficznie
jednorodny produkt (1,49 g) w postaci bezposta-
ciowego proszku, który niezbyt ostro topi się
w temperaturze 175—190°. Na silikażelu wykazuje
on następujące wartości Rf:

Rf (43A) = 0,41
Rf (chloroform-metanol = 9:1) = 0,24

7) BOC-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu"-OtBu/-His-Fe-
-Arg-Try-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-
-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Pro-Wal-Liz/BOC/-
-Wal-Tyr-Pro-OtBu.

378 mg BOC-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu"-OtBu/His-Fe-
-Arg-Try-Gli-OH (Case 5503, G.Nr 10583(64) i 451
mg H-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-
-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-
-Pro-OtBu zawiesza się w 4 ml absolutnej piry-
dyny i po dodaniu 0,15 ml wody i 0,32 ml 1 n
kwasu solnego miesza przez 10 minut w tempe-
raturze 50°. Do mętnej zawiesiny dodaje się na-
stępnie 145 mg dwucykloheksylokarbodwuimidu i
po 3 godzinach jeszcze raz dodaje taką samą
ilość. Miesza się jeszcze przez dalsze 3 godziny
w temperaturze 50° i odstawia na noc przy 0°. Wydzielony dwucykloheksylomocznik odsąca się
i 3-krotnie przemywa po 0,8 ml 90% pirydyny.
Przesącz traktuje się 45 ml benzenu, przy czym
wytrąca się surowy produkt w postaci proszku,
który odsąca się i suszy w temperaturze 45°. Przez ponowne wytrącenie z układu metanol-ben-
zen-eter naftowy oddziela się większość zanie-
czyszczeń lipofilowych, po czym ostateczne oczy-
szczenie następuje według rozdzielu Craig'a w
układzie rozpuszczalników metanol-bufor-chloro-
form-czterochlorek węgla (10:3,17:5:4) [bufor jak
w punkcie 2)] w 300 stopniach, przy objętości faz
po 10 ml. Z elementów rozdzielu nr 51—85
($\mu_{\max}$ = 67, K = 0,29) izoluje się przez zagęsz-
czenie do sucha i odsublimowanie w wysokiej
próżni octanu amonu w temperaturze 40°, 445 mg
chromatograficznie czystego, chronionego octanu
tetrakozapeptydu w postaci bezpostaciowego pro-
szku o temperaturze topnienia około 205—210°
(rozkład).

Na silikażelu wykazuje on następujące warto-
ści Rf:

Rf (43A) = 0,63
Rf (100) = 0,60
Rf (chloroform-metanol = 75:25) = 0,42

8) H-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gli-
-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Liz-Liz-Pro-Wal-Liz-
-Wal-Tyr-Pro-OH/D-Ser^{17,18}- β ¹⁻²⁴-kortikotro-
pina).

370 mg chronionej pochodnej tetrakozapeptydu
rozpuszcza się w 7,4 ml 90% kwasu trójfluorocto-
wego i odstawia na 45 minut w temperaturze 25°. Roztwór zagęszcza się następnie do około 2 ml,
rozcieńcza 20 ml wody, jeszcze raz zagęszcza i
ostatecznie liofilizuje. Otrzymuje się trójfluoro-
octan wolnego tetrakozapeptydu, który w celu

przeprowadzenia w octan rozpuszcza się w małej ilości wody i przesącza przez kolumnę ($\phi = 12,5$ mm; $l = 15$ cm) słabo zasadowego wymiennicza jonowego (na przykład Merck'a nr II) w postaci octanowej. Eluat zateża się do około 3 ml, liofilizuje w wysokiej próżni dodatkowo suszy w temperaturze 40° . Otrzymuje się 316 mg chromatograficznie i elektroforetycznie jednolitego octanu D-Ser¹-Liz^{17,8}, β -²⁴-kortikotropiny w postaci białego, bezpostaciowego proszku.

Na chromatogramie cienkowarstwowym na tlenku glinu w układzie 101 związek ten wykazuje wartość $R_f = 0,40$ (β ¹⁻²⁴-kortikotropina w tych samych warunkach 0,51). Przesuwa się ona w czasie elektroforezy (16 obj/cm) przy $Ph = 6,1$ (bufor z octanu pirydyny) w ciągu 2 godzin o 8,4 cm w kierunku katody.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych peptydów o działaniu ACTH, **znamienny tym**, że z D-Serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-metionylo-L-glutamylo-L-histydylo-L-fenylalaninylo-L-arginylo-L-trypto-

fylo-glicylo-L-lizylo-L-propylo-L-walilo-glicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-propylo-L-walilo-L-lizylo-L-walilo-L-tyrozylo-L-proliny lub z odpowiedniego związku, który zamiast reszty glutamylowej posiada resztę glutaminy, w których to peptydach chronione są co najmniej grupa α -aminowa i grupy aminowe w łańcuchach bocznych jak też końcowa grupa karboksylowa i grupa karboksylowa ewentualnie obecna w łańcuchu bocznym, odszczepia się grupy ochronne, po czym otrzymane polipeptydy przeprowadza się ewentualnie w ich addycyjne sole z kwasami, lub w estry, amidy, hydrazydy albo w związki kompleksowe.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że grupy ochronne odszczepia się z peptydu, w którym grupy aminowe chronione są przez grupę III-rzęd. butylo-oksykarbonylową, a grupy karboksylowe chronione są przez grupę III-rzęd. butyloestrową.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że grupy ochronne odszczepia się za pomocą kwasu trójfluorooctowego.

Dokonano dwóch poprawek

