



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

59570

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 11.XI.1966 (P 117 317)

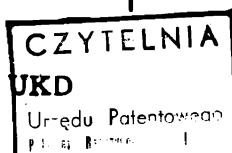
Pierwszeństwo: 12.XI.1965 Szwajcaria

Opublikowano: 25.III.1970

Kl. 12 q, 6/01

MKP C 07 c

103/52



Właściciel patentu: CIBA Société Anonyme, Bazylea (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania nowych peptydów o działaniu ACTH

1

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób wytwarzania D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-metionylo-L-glutamylo-L-histydilo-L-fenylalanilo-L-agrinilo-L-tryptofanylo-glicylo-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-glicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-1-lizyny, jak też odpowiedniego związku, który zamiast reszty glutamylowej zawiera resztę glutaminy, ich soli addycyjnych z kwasami, pochodnych takich jak estry, amidy i hydrozydy lub związków kompleksowych.

Z belgijskiego opisu patentowego nr 668250 znany jest sposób wytwarzania 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 H-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gli-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-OH (D-Ser¹- β^{1-19} -kortikotropina).

Stwierdzono, że amid okta-dekapeptydu, który zamiast reszty argininy zawiera w pozycji 17, 18 resztę lizyny, wykazuje prawie tak samo dobre działanie adrenokortikotropowe. Nowy peptyd, stanowiący amid D-Ser¹, Liz^{17,18}- β^{1-18} -kortikotropiny, w którym grupa amidowa znajduje się w pozycji Liz¹⁸, jest łatwiejszy do otrzymania aniżeli D-Ser¹- β^{1-19} -kortikotropinę, ponieważ nie

2

zawiera on resztę argininy w pozycji 17, 18, utrudniających wytworzenie peptydu ze względu na resztę guanidynową w łańcuchu bocznym.

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

Jako sole addycyjne z kwasami wymienia się szczególnie sole kwasów nadających się do stosowania w terapii, jak kwas solny, kwas octowy, przede wszystkim jednak sole trudnorozpuszczalne jak siarczany, fosforany lub sulfoniany.

Jako pochodne należy rozumieć np. estry, jak niższe estry alkilowe np. metylowy, etylowy, propylowy, III-rzęd. butylowy, lub estry benzylowe niepodstawione albo podstawione np. grupą nitrową, atomami chlorowca, niższymi grupami alkilowymi albo alkoksylowymi, poza tym hydrazydy i amidy, zwłaszcza amid D-Ser¹-Liz^{17,18}- β -kortikotropino-lizyny¹⁸.

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.

Stosowanymi substancjami nieorganicznymi są związki wywodzące się z metali jak wapń, magnez, glin, kobalt a zwłaszcza cynk, przede wszyst-

kim trudno rozpuszczalne sole jak fosforany i pirofosforany jak też wodorotlenki tych metali. Organicznymi substancjami powodującymi przedłużenie działania są np. antygenna żelatyna np. oksypoliżelatyna, poliwinylpirolidon 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 np. 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 adrenokortikotropową, aniżeli odpowiednie związki z konfiguracją L przy pierwszym aminokwasie. Należy je odpowiednio do tego stosować w medycynie i weterynarii np. zamiast naturalnego hormonu.

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

Sposób według wynalazku polega na tym, że z D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo-L-metionilo-L-glutamilo-L-histydilo-L-fenilo-L-alanylo-L-arginylo-L-tryptofylo-L-glicylo-L-lizylo-L-prolilo-L-walilo-L-glicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizyny albo z odpowiedniego związku, zawierającego zamiast reszty glutamylowej resztę glutaminową, 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 w łańcuchu bocznym grupa karboksylowa, odszczybia się grupy ochronne i jeżeli to jest pożądane, otrzymane związki przeprowadza się w sole addycyjne z kwasami, pochodne lub w związki kompleksowe.

Połączenie aminokwasów i/lub peptydów o mniejszych cząsteczkach 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 np. 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 np. przez przeprowadzenie w halogenek kwasowy, azydek, bezwodnik, imidazol, izoksazolid lub w aktywowany ester jak ester cyjanometylowy, karboksymetylowy, p-nitrofenyloowy lub przez reakcję za pomocą karbodwuimidu (ewentualnie z dodatkiem imidu kwasu N-hydroksybutyrynowego) lub N,N'-karbonyldwuimidoazolu, zaś grupę aminową można aktywować przez reakcję z fosfatoamidem. Jako najbardziej korzystne metody wymienia się metodę

karbodwuimidową, azydową, metodą aktywowanych estrów i metodą bezwodnikową. Podkreślić należy również tzw. syntezę z nośnikiem stałym, w której peptyd rozbudowuje się od końca grupy karboksylowej, związanej estrowo z polimerem, przez kolejne dokondensowywanie aminokwasów.

Wolne grupy funkcjonalne nie biorące udziału w reakcji chroni się korzystnie za pomocą reszt dających się łatwo odszczyścić na drodze hydrolizy lub redukcji i tak grupy karboksylowe korzystnie przez zestryfikowanie np. metanolem, III-rzęd. butanolem, alkoholem benzyloowym, alkoholem p-nitrobenzyloowym lub przez utworzenie amidu, grupy aminowe np. przez wprowadzenie grupy toluenosulfonylowej, trójfenylo-metylowej, formylowej, trójfluoroacetylowej, o-nitrofenylosulfonylowej, ftalilowej lub grupy karbobenzoksylowej albo barwnych grup ochronnych jak grupy p-fenylazo-benzyllooksykarbonylowej i grupy p/p'-metoksy-fenylazo/-benzyllooksykarbonylowej lub przede wszystkim III-rzęd. reszty butyllooksykarbonylowej. 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 grupą benzyloową 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 zawierający pierwsze 3 aminokwasy, H.D. Ser-Tyr-Ser-OH (skrótów odnoszą się do L-aminokwasów, jeżeli D nie zaznaczono specjalnie), lub cztero-peptyd, który oprócz tego zawiera czwarty aminokwas poddaje się kondensacji z hepta-peptydem względnie heksa-peptydem następnych aminokwasów aż do 10 aminokwasu, korzystnie metodą azydową, a następnie deka-peptyd kondensuje się z estrem lub amidem okta-peptydu aminokwasów 11-18.

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 konieczne jest izolowanie samego estru p-nitrofenylowego deka-peptydu, lecz można go również wytworzyć 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. Grupy aminowe obecne w łańcuchach bocznych odcinków (częstek składowych) peptydu poddawanych kondensacji chroni się korzystnie za pomocą grupy III-rzęd. butyllooksykarbonylowej a grupy karboksylowe za pomocą grupy III-rzęd. butyloestrowej. Grupy ochronne można odszczyścić w ostatnim stopniu za pomocą kwasu trójfluorooctowego.

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, jak też otrzymane przy tym produkty pośrednie.

W zależności od sposobu prowadzenia procesu 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 np. z kwasami nieorganicznymi jak kwasy chlorowodorowe np. kwas solny lub kwas bromowodorowy, kwasy nadchlorowy, azotowy lub tiocyjanowy, kwas siarkowy lub fosforowy, lub z kwasami organicznymi jak kwas mrówkowy, octowy, propionowy, glikolowy, mlekowy, pirogronowy, szczawiowy, malonowy, bursztynowy, maleinowy, fumarowy, jabłkowy, winowy, cytrynowy, askorbinowy, hydroksymaleinowy, dwuhydroksymaleinowy, benzoesowy, fenyloctowy, 4-aminobenzoesowy, 4-hydroksybenzoesowy, antranilowy, cynamonowy, migdałowy, salicylowy, 4-aminosalicylowy, 2-fenoksybenzoesowy, 2-acetoksybenzoesowy, 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 lub też pozajelitowego. Jako nośniki brane są pod uwagę substancje, które nie reagują z peptydami jak np. żelatyna, cukier mlekowy, glukoza, sól kuchenna, skrobia, stearynian magnezu, talk, oleje roślinne, alkohole benzylowe, guma, poliglikole alkilenowe, wazelina, cholesterolina lub inne znane nośniki leków. Preparaty farmaceutyczne mogą występować np. w postaci liofilizatów lub 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 naturalny ACTH można również podawać w postaci preparatu o przedłużonym działaniu jak np. z oksypolizelatyną, 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 zmieniona pod względem funkcjonalnym i może występować

np. jako grupa estrowa lub jako grupa amidowa niepodstawiona lub podstawiona resztami węglowodorowymi, przede wszystkim niższymi grupami alkilowymi. Ciężar cząsteczkowy polimerów może wynosić 1000—100000, korzystnie wynosi 2000—15000. Do wytwarzania preparatów stosuje się korzystnie rozpuszczalną w wodzie sól, dopuszczalną fizjologicznie np. sól sodową lub amonową albo sól z organiczną zasadą jak trójetyloamina, prokaina, dwubenzylamina lub z innymi trzeciorzędowymi zasadami zawierającymi azot.

Polimery są znane lub można je wytworzyć znanymi metodami np. według sposobu opisanego przez M. Idelson'a i innych w J. Am. Chem. Soc. 80, 4631 et seq (1958). Tak np. ester: kwas glutaminowy- α -karboksybezwodnik- γ -benzylowy lub -III-rzęd. butylowy w dioksanie, poddaje się reakcji z amoniakiem lub z aminą w określonym stosunku molowym np. 100:1 (w zależności od pożądanego stopnia polimeryzacji), a po skończonej polimeryzacji odszczepia grupy ochronne np. grupę benzyllooksylową bromowodorem w lodowatym kwasie octowym, a III-rzęd. grupę butyllooksylową kwasem trójfluorooctowym. W celu wytworzenia polimerów o jednolitej, określonej długości łańcucha, można wytwarzać je na drodze syntezy metodami przyjętymi w chemii peptydów (metoda karbodwuimidowa, metoda azydowa itd.).

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

Stężenie peptydu czynnego adrenokortikotropowo dobiera się tak, ażeby preparat wykazywał np. 10—50 jednostek międzynarodowych (I.E.) 1 ml.

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

Układy chromatogramów cienkowarstwowych oznaczono następująco: Układ 43 A: III-rzęd. alkohol amyłowy-izopropanol-woda (100:40:10). Układ 43C: III-rzęd. alkohol amyłowy-izopropanol i woda (100:40:55). Układ 52: n-butanol-lodowaty kwas octowy-woda (100:10:30), Układ 52A: n-butanol-lodowaty kwas octowy-woda (67:10:23). Układ 100: octan etylu-pirydyna-lodowaty kwas octowy-woda (62:21:6:11). Układ 101: -n-butanol-pirydyna-lodowaty kwas octowy-woda (30:20:6:24).

Stosuje się następujące skróty:

Z = grupa karbobenzylowa

BOC — grupa III-rzęd. butyllooksykarbonylowa

tBu — grupa III-rzęd. butylowa

Przykład 1) Z-Liz(BOC)-Liz(BOC)-NH₂

5 g Z-Liz(BOC)-Liz(BOC)-OCH₃ rozpuszcza się w 100 ml absolutnego metanolu, nasyca amoniakiem w temperaturze pokojowej i odstawia na 30 godzin w zamkniętej kolbie. Roztwór zagęszcza się następnie do około 25 ml i odstawia na noc do krystalizacji w lodówce. Odsącza się, przemywa małą ilością zimnego metanolu i suszy krystalą w próżni. Otrzymuje się 3,95 g Z-Liz(BOC)-Liz(BOC)-NH₂ o temperaturze topnienia 165°. Związek wykazuje przy chromatografowaniu cienkowarstwowym na silikażelu następujące wartości R_f:

Rf (chloroform-metanol = 95:5) = 0,11
 Rf (chloroform-metanol = 8:2) = 0,75
 Rf (43A) = 0,76

Stosowany jako materiał wyjściowy Z-Liz(BOC)-Liz(BOC)-OCH₃, o temperaturze topnienia 78–84° można wytworzyć z Z-Liz(BOC)-OH i H-Liz(BOC)-OCH₃ przez kondensację za pomocą dwucykloheksylokarbodwuimidu, według sposobu podanego w belgijskim opisie patentowym nr 594 338.

2) H-Liz(BOC)-Liz(BOC)-NH₂

3 g Z-Liz(BOC)-Liz(BOC)-NH₂ rozpuszcza się, lekko ogrzewając w 100 ml metanolu i uwodornia w temperaturze pokojowej we wstrząsarce w obecności 500 mg 10% palladu na węglu, przy czym absorbuje się powstający dwutlenek węgla. Uwodornienie prowadzi się przez około 1 godziny, a po upływie następnej godziny odsąca się katalizator, a przesącz zagęszcza do sucha. Otrzymany z ilościową wydajnością surowy produkt przekryształizowuje się z układu octan etylu-eter naftowy, po czym wykazuje on temperaturę topnienia 110–112°.

Na silikażelu otrzymuje się następujące wartości Rf:

Rf (chloroform-metanol = 8:2) = 0,32
 Rf (43A) = 0,35
 Rf (52) = 0,65

3) Z-Liz(BOC)-Pro-Wal-Gli-Liz(BOC)-Liz(BOC)-Liz(BOC)-Liz(BOC)-NH₂

5,13 g Z-Liz(BOC)-Pro-Wal-Gli-Liz(BOC)-Liz(BOC)-NHNH₂ (G. nr 2209) 63 [Case 5247/5123] rozpuszcza się w 60 ml absolutnego dwumetyloformamidu i oziębia do temperatury –25°. W temperaturze tej dodaje się kroplami, mieszając 8,8 ml 2,115n kwasu solnego, a następnie 0,973 ml 5n roztworu azotynu sodowego. Roztwór reakcyjny miesza się przez 15 minut w temperaturze –10°, po czym dodaje do niego wstępnie oziębiony do temperatury –10° roztwór 2,0 g H-Liz(BOC)-Liz(BOC)-NH₂ w 10 ml dwumetyloformamidu, a następnie wkrapla jeszcze 2,6 ml trójetyleaminy. Miesza się przez 30 minut w temperaturze 0°, w tej samej temperaturze pozostawia przez około 20 godzin, po czym zagęszcza się do około 30 ml, wytrąca 150 ml wody i odsąca kłaczkowato-galaretowaty osad. Po dwukrotnym przekryształizowaniu z metanolu i wody (2:1) chroniony oktapeptyd otrzymuje się w postaci drobnokrystalicznej i czystej chromatograficznie. Temperatura topnienia = 220–221° z rozkładem. Wykazuje on na silikażelu następujące wartości Rf:

Rf (chloroform-metanol = 9:1) = 0,47
 Rf (43A) = 0,75

4) H-Liz(BOC)-Pro-Wal-Gli-Liz(BOC)-Liz(BOC)-Liz(BOC)-Liz(BOC)-NH₂

1,0 g wyżej opisanego związku karbobenzoksylowego rozpuszcza się w 250 ml metanolu i uwodarnia we wstrząsarce 200 mg 10% palladu na węglu w temperaturze pokojowej i przy absorpcji dwutlenku węgla. Po 6 godzinach odsąca się katalizator, przesącz zagęszcza do sucha, a pozostałość

wytrąca jeszcze dwukrotnie z układu metanol-woda. Otrzymuje się 738 mg chromatograficznie jednorodnej pochodnej oktapeptydu, która na silikażelu wykazuje następujące wartości Rf:

Rf (chloroform-metanol = 9:1) = 0,14
 Rf (52) = 0,63
 Rf (43A) = 0,28

5) BOC-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OtBu)-His-Fe-Arg-Try-Gli-Liz(BOC)-Pro-Wal-Gli-Liz(BOC)-Liz(BOC)-Liz(BOC)-NH₂

988 g BOC-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OtBu)-His-Fe-Arg-Try-Gli-OH i 736 g H-Liz(BOC)-Pro-Wal-Gli-Liz(BOC)-Liz(BOC)-Liz(BOC)-Liz(BOC)-NH₂ zawieszają się w 20 ml pirydyny i po dodaniu 0,3 ml wody i 0,835 ml 1-n kwasu solnego miesza przez 15 minut w temperaturze 50°. Po dodaniu 378 mg dwucykloheksylokarbodwuimidu miesza się przez 3 godziny w temperaturze 50°C, dodaje powtórnie taką samą ilość dwucykloheksylokarbodwuimidu, miesza przez dalsze 3 godziny w tej samej temperaturze i zagęszcza do powstania półstałej pozostałości. Przez ogrzewanie z 20 ml dwumetyloformamidu peptydy zostają rozpuszczone i na drodze odsączenia oddzielone od nierozpuszczalnego dwucykloheksylomocznika.

Przesącz zagęszcza się do uzyskania gęstej pozostałości, dodaje 50 ml wody, przy czym wytrąca się maziasty surowy produkt, który oddziela się od ługu macierzystego i suszy. Przez dwukrotne wytrącenie z układu dwumetyloformamid-metanol-octan etylu otrzymuje się 1,29 g surowego produktu, który w celu ostatecznego oczyszczenia poddaje się rozdzielaniu według Craig'a w układzie rozpuszczalników metanol-bufor-chloroform-czterochlorek węgla (10:3:7:4) [bufor = 28,5 ml lodowatego kwasu octowego + 19,25 g octanu amonu w 960 ml wody] przy objętości faz po 10 ml. (Na początku substancją równomiernie rozdzieloną napełnia się pierwszych 5 elementów). Po 171 stopniach wydziela się z elementów nr 50–75 (E_{max} = 62; K = 0,57) przez zagęszczenie do sucha i odsublimumowanie octanu amonu w temperaturze 40° w wysokiej próżni, jednolity chromatograficznie chroniony amid oktapeptydu, w postaci czystego, bezpostaciowego proszku o temperaturze topnienia około 210–225° z rozkładem. Na silikażelu wykazuje on następujące wartości Rf:

Rf (chloroform-metanol = 75:25) = 0,51
 Rf (43c) = 0,62
 Rf (52) = 0,55
 Rf (100) = 0,43

Stosowana jako substancja wyjściowa pochodna deka-peptydu opisana jest w patencie belgijskim nr 668 250.

6) H-D-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Try-Gli-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Liz-Liz-NH₂ (Amid D-Ser¹-Liz^{17,18}-β¹-18-kortikotropino-lizyny¹⁸).

400 mg chronionego amidu oktapeptydu rozpuszcza się w 8 ml 90% kwasu trójfluorooctowego i pozostawia do odstania na 30 minut w tempera-

turze 25°. Następnie zagęszcza się do objętości około 3 ml dodaje 20 ml wody, jeszcze raz zagęszcza i liofilizuje. Otrzymany tak trójfluorooctan amidu okta-dekapeptydu w celu przekształcenia w octan rozpuszcza się w małej ilości wody i powoli sączy przez kolumnę ($\varnothing = 11$ mm; $l = 16$ cm) słabo zasadowego wymiennicza jonowego (np. Merck nr II) w postaci octanowej. Eluat zateża się do małej ilości objętości, liofilizuje i dodatkowo suszy w wysokiej próżni w temperaturze 40°. Otrzymuje się 301 mg chromatograficznie i elektroforetycznie jednorodnego octanu amidu D-Ser¹-Liz^{17,18}- β^{1-18} -kortikotropino-lizyny¹⁸ w postaci bezpostaciowego białego proszku o nieostrej temperaturze rozkładu wynoszącej około 170—180°. Na chromatogramie cienkowarstwowym na tlenku glinu otrzymuje się następujące wartości Rf:

Rf (52A) = 0,13

Rf (101) = 0,32

Przy elektroforezie bibułowej (16 Volt/cm) przy pH = 6,1 (bufor-octan pirydyny) związek przesuwa się w ciągu 2 godzin 11,5 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-metionilo-L-glutamylo-L-histydilo-L-feniloalanylo-L-arginylo-L-tryptofylo-glicylo-L-lizylo-L-propylo-L-waliloglicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizyny lub z odpowiedniego związku, który zamiast reszty glutamylowej zawiera 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 i ewentualnie otrzymane związki przeprowadza się w ich sole addycyjne z kwasami, w pochodne takie jak estry, amidy i hydrazydy lub 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. butylooksykarbonylową, a grupy karboksylowe przez grupę III-rzęd. butyloestrową.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że wszystkie grupy ochronne odszczepia się za pomocą kwasu trójfluorooctowego.