



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 13.09.73 (P. 165192)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 01.10.74

Opis patentowy opublikowano: 15.04.1977

MKP C07c 103/52

Int. Cl.³ C07C 103/52

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt., Budapeszt
(Węgry)

Sposób wytwarzania nowych peptydów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych peptydów o wzorze X-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-Wal-Tyr-Pro-Y, w którym X oznacza resztę -O Gli, -O Ala, D-O Ala; -O Ser, albo D-O Ser, a Y oznacza ugrupowanie -Asp-Ala-Gli-Glu, albo -Asn-Gli-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala, oraz ich soli addycyjnych z kwasami, pochodnych i związków zespolonych.

Peptydy wytwarzane sposobem według wynalazku wykazują aktywność ACTH i zawierają kwasy α-aminoksykarboksylowe w ich N-kończym fragmencie cząsteczki.

Wiadomo, że łańcuch peptydowy hormonu adrenokortykotropowego /ACTH/ może być w znacznej mierze modyfikowany i nie powoduje to zaniku jego adrenokortykotropowej aktywności. W ten sposób z C-końcowego fragmentu cząsteczki może być usunięta więcej niż jedna trzecia część łańcucha aminokwasowego bez zmniejszenia specyficznej aktywności. Odszczepienie dalszych aminokwasów prowadzi do nagłego spadku aktywności. Peptyd zawierający sekwencję aminokwasów 1-19 hormonu ACTH posiada 30% aktywności oryginalnej cząsteczki, podczas gdy aktywność fragmentu ACTH o sekwencji aminokwasów 1-16 wynosi zaledwie 1% w porównaniu ze związkiem wyjściowym. Z drugiej strony, usunięcie pierwszego aminokwasu z N-końcowego fragmentu cząsteczki prowadzi do 50% spadku aktywności /E. Schroder, K. Lubke:

2

The Peptides, Academic Press, New York, 1966, str. 246-249/.

Fragmenty ACTH, w których N-końcowa grupa seryny zastąpiona jest przez D-aminokwas, nie-naturalny aminokwas lub grupę acylową otrzymane drogą odłączenia grup funkcyjnych seryny /np. grup β-hydroksypropionylowej lub propionylowej/ wykazują czasami aktywności przekraczające aktywność naturalnego ACTH. Może to być przypuszczalnie związane z faktem, że fragmenty ACTH o zmodyfikowanej budowie wykazują oporność na działanie enzymów typu aminopeptydazy i dlatego ich szybkość rozpadu w organizmie jest mniejsza niż naturalnego ACTH.

Dlatego też zmodyfikowane fragmenty ACTH wykazują znaczne adrenokortykotropowe aktywności także w tych przypadkach, gdy modyfikująca grupa nie może całkowicie odgrywać roli N-końcowego serynowego fragmentu cząsteczki naturalnego hormonu. Z podstawionych peptydów ACTH zostały opisane pochodne D-seryny /brytyjskie opisy patentowe nr nr 1 110 353 i 1 153 455/ pochodne sarkozyny, β-alaniny i kwasu α-aminomasłowego /opublikowane niemieckie zgłoszenie patentowe nr nr 2 055 151, 2 034 698, 2 144 300, 2 124 540 i 2 112 533/ jak również pochodne β-hydroksypropionowe i propionowe /francuskie opisy patentowe nr 1 513 943 i nr 1 513 944 oraz brytyjski opis patentowy nr 1 153 594/.

Obecnie stwierdzono, że zastąpienie N-końcowej

grupy serynowej cząsteczki ACTH lub jej fragmentów kwasem zawierającym ugrupowanie α -aminooksy pozwala otrzymać związki o zwiększonej oporności na działanie czynników enzymatycznych. Szczególnie aktywne okazały się pochodne L- i D- α -aminooksypropionylowe oraz L- i D- α -aminooksy- β -hydroksypropionylowe. Fakt ten ma znaczenie z uwagi na to, że jakkolwiek wymienione aminooksykwasy są strukturalnie bardzo zbliżone do glicyny, alaniny i seryny /różnica polega tylko na tym, że aminooksykwasy zawierają dodatkowy atom tlenu pomiędzy atomem węgla w pozycji α i grupą aminową/ to jednak ich właściwości fizyko-chemiczne są zupełnie odmienne.

W związku z powyższym wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowych peptydów, wykazujących aktywność ACTH, mających całkowitą sekwencję ACTH od N-końcowego aminokwasu przynajmniej do szesnastego aminokwasu, ale zawierających inne dowolne aminokwasy w miejscu poszczególnych aminokwasów sekwencji ACTH i zawierających zawsze α -aminooksykwas w miejscu pierwszego aminokwasu. Wynalazek dotyczy również sposobu wytwarzania soli addycyjnych z kwasami, pochodnych i związków kompleksowych wymienionych peptydów.

Sposobem według wynalazku wytwarza się nowe związki, które mogą być na przykład podstawionymi peptydami, zawierającymi za pierwszym aminooksykwasem fragmenty od 2—16 do 2—39 naturalnej cząsteczki ACTH. W podstawionych peptydach poszczególne aminokwasy naturalnej sekwencji ACTH mogą być zastąpione innymi aminokwasami pod warunkiem, że zastąpienie to nie spowoduje znacznego obniżenia aktywności w porównaniu z ACTH. W ten sposób, na przykład drugi aminokwas /tyrozyna/ może być zastąpiony fenyloalaniną i/lub trzeci aminokwas /seryna/ może być zastąpiony lizyną i/lub czwarty aminokwas /metionina/ może być zastąpiony leucyną, norwaliną, norleucyną albo kwasem α -aminomasłowym i/lub piąty aminokwas /kwas glutaminowy/ może być zastąpiony glutaminą i/lub aminokwasy piętnasty i szesnasty /lizyna/ mogą być zastąpione ornityną i/lub aminokwasy siedemnasty i osiemnasty /arginina/ mogą być zastąpione lizyną lub ornityną.

Takie możliwości zastąpienia istnieją przede wszystkim w odniesieniu do fragmentu aminokwasów 25—32, ponieważ nawet oryginalne cząsteczki ACTH wykazują różnice w budowie tego fragmentu. Najbardziej korzystnymi związkami z uwagi na ich aktywności adrenokortykotropowe są /L- lub D-OSer¹, Asp²⁵, Ala²⁶, Gln²⁷/- α ¹⁻²⁸-ACTH i /D-OSer¹- α _n⁻³²-ACTH, w których „OSer” reprezentuje kwas α -aminooksy- β -hydroksypropionowy różniący się od seryny tylko pojedynczym atomem tlenu pomiędzy atomem węgla w pozycji α i grupą aminową. W części szczegółowej opisu zostały zastosowane skróty dla oznaczenia α -aminooksykwasów mających zbliżoną budowę do aminokwasów i tak na przykład OGly oznacza kwas α -aminooksyooctowy. OAla oznacza kwas α -aminooksypropionowy itd.

Sposobem według wynalazku wytwarza się nowe peptydy wykazujące aktywność ACTH, jak również

ich sole addycyjne z kwasami, pochodne i związki kompleksowe, stosując jako produkt wyjściowy chroniony peptyd, posiadający pełną sekwencję ACTH od N-końcowego aminokwasu przynajmniej do szesnastego aminokwasu, ale zawierający inne dowolne aminokwasy w miejscu poszczególnych aminokwasów sekwencji ACTH, zawsze zawierający α -aminooksykwas w miejscu aminokwasu pierwszego i niosący grupy ochraniające przynajmniej na ostatniej aminooksygrupie i na grupach aminowych łańcuchów bocznych i dowolnie także na końcowej grupie karboksylowej i grupach karboksylowych łańcuchów bocznych, dający możliwość ich odszczepienia w co najmniej jednym etapie i ewentualnie wytworzony związek przekształca się w sól addycyjną z kwasem, pochodną lub związek kompleksowy.

Chronione peptydy, stosowane w sposobie według wynalazku jako związki wyjściowe wytwarza się z α -aminooksykwasów i aminokwasów drogą częściowej kondensacji lub stopniowego wprowadzania poszczególnych aminokwasów we właściwej sekwencji. W tym ostatnim procesie stosuje się metodę mieszanych bezwodników, metodą azydkową, metodą aktywnych estrów lub metodą z użyciem cykloheksylokarbodwuimidu /DCC/. Stosowana być może również metoda tzw. syntezy w fazie stałej w zależności od tego, który peptyd w kontakcie z polimerem na jego końcowej grupie karboksylowej zostaje rozbudowany przez utworzenie wiązania C-końcowego aminokwasu polimeru z aminokwasami i z N-końcowym α -aminooksykwasem we właściwej sekwencji.

Reaktywne grupy, nie biorące udziału w reakcji podstawione są grupami chroniącymi, które mogą być w łatwy sposób ponownie usunięte, np. drogą hydrolizy, hydrolizy kwasowej, hydrazynolizy lub redukcji. Grupa karboksylowa jest korzystnie chroniona w formie grupy estru metylowego, III-rzęd.-butylowego, benzylowego lub p-chlorobenzylowego lub drogą przekształcenia w amid. Aminooksygrupy i grupy aminowe chronione są za pomocą grupy tozylowej, tritylowej, formylowej, trójfluoroacetylowej, o-nitrosulfenylowej, ftalilowej, benzylooksykarbonylowej, p-chlorobenzyllooksykarbonylowej i najczęściej III-rzęd.-butyllooksykarbonylowej. Grupa guanidynowa cząsteczki argininy jest najkorzystniej chroniona grupą nitrową, ale może być również chroniona w formie protonowej. Grupa aminowa histydyny może być chroniona grupą benzylową, tritylową lub grupą dwunitrofenylową. Grupy hydroksylowe znajdujące się w łańcuchach bocznych mogą być chronione drogą tworzenia eteru, przy czym najkorzystniejsze jest tworzenie eterów III-rzęd.-butylowego i benzylowego.

Za pomocą prawidłowego doboru grup chroniących można uzyskać związki łatwo ulegające selektywnemu odszczepieniu grup chroniących lub ulegające odszczepieniu w jednym etapie za pomocą hydrolizy, hydrolizy kwasowej, hydrazynolizy lub redukcji.

Sposobem według wynalazku chroniony α -aminooksykwas korzystnie kondensuje się z estrem metylowym trójpeptydu o wzorze Tyr-Ser-Met-OCH₃, otrzymany ester metylowy podstawionego peptydu

przekształca się w hydrazyd, a następnie w azydek i ten związek stosuje się do acylacji deka-peptydu o wzorze Glu/OBUT/-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli. Tak otrzymany podstawiony tetradekapeptyd kondensuje się z odpowiednio chronionym C-końcowym fragmentem. Np. podstawiony tetradekapeptyd kondensuje się z 15—16 dwupeptydem, 15—18 tetrapeptydem, 15—28 tetradekapeptydem, 15—32 oktadekapeptydem lub 15—39 tetrakozapeptydem, uzyskując odpowiednio podstawiony heksadekapeptyd, oktadekapeptyd, oktakoza-peptyd, dotriakontapeptyd lub nonatriakontapeptyd. W tej reakcji kondensacji korzystnie stosuje się dwucykloheksylokarbodwuimid /DCC/ lub metodę estrów aktywnych. W tej ostatniej metodzie, szczególnie gdy stosuje się ester pięcioklorofenylowy lub pięciofluorofenylowy, aktywny ester nie musi być tworzony oddzielnie ale może powstawać bezpośrednio w mieszaninie reakcyjnej z podstawionego tetradekapeptydu z pięcioklorofenolem lub pięciofluorofenolem i dwucykloheksylokarbodwuimidem /DCC/ /patrz brytyjski opis patentowy nr 1 201 053/.

Chronione peptydy, zawierające zawsze α -amino-kwas w pozycji 1 i stosowane jako związki wyjściowe wytwarza się sposobem według wynalazku opisanym poniżej.

Właściwie chroniony C-końcowy fragment acyluje się za pomocą chronionego 5—14 deka-peptydu, N-końcowa chroniąca grupa tak otrzymanego podstawionego peptydu zostaje usunięta, a uzyskany związek poddaje się acylowaniu za pomocą odpowiednio podstawionego 1—4 tetrapeptydu. Tym sposobem tetrapeptyd zawierający α -aminokwas jako N-końcowe ugrupowanie zostaje przekształcony bezpośrednio w chroniony peptyd zawierający N-końcowy α -aminokwas, użyteczny jako substancja wyjściowa w sposobie według wynalazku.

Przy końcu syntezy grupy III-rzęd.-butylooksy-karbonylowe, związane z N-końcową grupą α -aminokwasu i z grupami aminowymi łańcuchów bocznych, estrowe grupy III-rzęd.-butylowe związane z grupami karboksylowymi łańcuchów bocznych, a także z C-końcową grupą karboksylową, jeśli nie przeprowadzono jej w amid, jak również eterowe grupy III-rzęd.-butylowe związane z grupami hydroksylowymi łańcuchów bocznych od-szczepia się na drodze hydrolizy kwasowej, np. działaniem kwasu trófluorooctowego. Pozbawiony grup chroniących produkt końcowy oczyszcza się za pomocą rozdziału przeciwwądrowego lub chromatografii kolumnowej, a także za pomocą chromatografii na żywicach jonowymiennych z użyciem różnych typów karboksymetylocelulozy.

Biologiczne aktywności nowych związków wymienionych w przykładach równe są w pewnych przypadkach aktywnościom poszczególnych fragmentów ACTH, nie zawierających cząsteczek α -aminokwasu. Ocenę przeprowadzono za pomocą testu Sayersa-Saffrana.

Zależnie od metod preparowania i warunków reakcji nowe związki otrzymuje się w postaci wolnych zasad lub ich soli. Sole mogą być przekształcone w wolne zasady za pomocą ogólnie znanych

metod, natomiast wolne zasady mogą być przekształcone w dopuszczalne do stosowania w lecznictwie sole addycyjne z kwasami przez działanie na nie kwasami organicznymi lub mineralnymi, takimi jak kwas solny, siarkowy, fosforowy, mrówkowy, octowy, mlekowy, winowy, cytrynowy oraz wyższe kwasy tłuszczowe.

Pochodnymi nowych związków, których sposób wytwarzania wchodzi w zakres wynalazku są estry, amidy, N-podstawione amidy, szczególnie amidy peptydów, zawierające grupy amidowe w C-końcowej grupie karboksylowej oraz zawierające wolne grupy karboksylowe w łańcuchach bocznych.

Związki kompleksowe do stosowania w lecznictwie wytwarza się przez połączenie nowych peptydów z pewnymi organicznymi lub mineralnymi substancjami gwarantującymi przedłużenie działania peptydów. Takimi organicznymi związkami są pewne typy żelatyny, różne karboksymetylocelulozy, aliginaty, polifloretynofosforany, spolimeryzowane aminokwasy oraz inne polimery lub kopolimery. Spośród związków mineralnych mogą być brane pod uwagę pewne pochodne metali, w pierwszym rzędzie wodorotlenki i trudno rozpuszczalne sole jak fosforany lub pirofosforany cynku. W celu uzyskania przedłużonego działania mogą być również stosowane pewne krzemiany, które tworzą z peptydami nierozpuszczalne związki kompleksowe o bliżej nieokreślonej budowie.

Nowe peptydy i ich sole, jak również pochodne i kompleksy mogą być stosowane w lecznictwie w postaci różnych form farmaceutycznych. Preparaty farmaceutyczne zawierają czynne składniki ewentualnie w mieszaninie z organicznymi lub mineralnymi domieszkami w zależności od potrzeby ich stosowania. Formami farmaceutycznymi mogą być stałe liofilizaty, zawierające związki obojętne w stosunku do peptydów jak mannitol, laktoza lub skrobia.

Zawiesiny lub emulsje mogą zawierać oprócz składników czynnych również dodatki zabezpieczające i stabilizujące. Większość korzystnych produktów farmaceutycznych zawiera nowe peptydy w formie wymienionych wyżej związków kompleksowych zapewniających przedłużenie ich działania.

Postacie farmaceutyczne mogą zawierać składniki czynne w ilościach powszechnie stosowanych dla hormonów adrenokortykotropowych, to jest w stężeniu 0,5—5 mg/ml. Postacie te mogą być podawane 1—7 razy dziennie podskórnie, domięśniowo lub dożylnie.

Poniższe przykłady szczegółowo ilustrują sposób według wynalazku.

Skróty użyte w przykładach dla oznaczenia pochodnych aminokwasów i peptydów są zgodne z zaleceniami IUPAC-IUB [J. Biol. Chem. 247, 977, /1972/].

α -aminokwasy oznaczono symbolami OGli, OAla, OSer.

Jeśli nie podano inaczej skróty te odnoszą się do konfiguracji L z wyjątkiem Gli i OGli. Ponadto w przykładach oznaczono symbolem PCPOH — pięcioklorofenol, PFPOH — pięciofluorofenol, DCC — dwucykloheksylokarbodwuimid, DCU — dwucykloheksylomocznik, BOC — III-rzęd.-butylo-

oksykarbonyl, B^t_u = III-rzęd.-butyl ONSU — N-sukcynimidyllooksy, Z — karbobenzylooksy. Temperatury topnienia wytworzonych związków oznaczono za pomocą aparatu typu Dr Tottoli /Büchli, Switzerland/. Badania chromatograficzne metodą chromatografii cienkowarstwowej przeprowadzono z użyciem żelu krzemionkowego według Stahla, stosując następujące mieszaniny rozpuszczalników:

1. octan etylu:/pirydyna: kwas octowy:woda = 20:6:4/=8:2
2. octan etylu:/pirydyna: kwas octowy:woda = 20:6:11/=6:4
3. octan etylu:/pirydyna: kwas mrówkowy:woda = 50:20:6:5,5
4. chloroform:metanol=98:2
5. chloroform:metanol=95:5.

Przykład I. OGli-Tyr-Ser-Met-Glu-His-fen-Arg-Trp-Gli-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-Wal-Tyr-Pro-Asp-Ala-Gli-Glu.

BOC-OGli-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr/But/-Pro-Asp/OBu^t/-Ala-Gli-Glu/OBu^t/-OBu^t.

3HCl w ilości 0,600 g /0,143 mola/ rozpuszcza się w mieszaninie sporządzonej z 4,8 ml kwasu trójfluorooctowego, 0,6 ml wody i 0,6 ml anizolu i roztwór pozostawia się w temperaturze pokojowej na godzinę. Po tym czasie dodaje się 60 ml eteru, a wydzielony osad odsącza, przemywa się eterem i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem nad pięciotlenkiem fosforu i wodorotlenkiem potasowym. Trójfluorooctan odpowiednio podstawionego oktakoza-peptydu otrzymuje się w ilości 0,538 g /87%/. Tak otrzymany surowy produkt w postaci trójfluorooctanu rozpuszcza się w 10 ml wody, a następnie jony trójfluorooctanowe wymienia się na jony octanowe stosując wymienniczkę jonową Dowex 1×8. Otrzymany roztwór octanu podstawionego oktakoza-peptydu przenosi się na kolumnę z wymienniczką jonową Whatman CM-52 i eluuje za pomocą buforów sporządzonych z octanu amonowego 0,01 molarnego /pH=4,5/ i 0,4 molarnego /pH=6,7/.

Zbrane właściwie frakcje łączy się, a następnie liofilizuje uzyskując 0,22 g /34%/. oktakoza-peptydu.

Analiza w oparciu o absorpcję w nadfiolecie wykazuje zawartość peptydu=72—73%, zawartość Met-sulfotlenku=1,3% i stosunek Tyr/Trp=2,05.

Analiza zawartości aminokwasów /teoretyczne wartości w nawiasie/

Liz: 4,05 /4/, His: 0,93 /1/, Arg: 3,08 /3/, Ser: 0,79 /1/, Glu: 2,01 /2/, Pro: 3,09 /3/, Gli: 3,04 /3/, Ala: 0,92 /1/, Wal: 3,12 /3/, Met: 0,60 /1/, Tyr: 1,88 /2/, Fen: 0,85 /1/.

Trójchlorowodorek podstawionego i chronionego oktakoza-peptydu, stosowany jako związek wyjściowy wytwarza się sposobem opisanym poniżej:

Etap 1. Kwas III-rzęd.-butylooksykarbonyloaminooksyoctowy /BOC-OGli/.

316,0 g /2,37 mola/ III-rzęd.-butylooksykarbonylohydroksyloaminy rozpuszcza się w 2680 ml etanolu, po czym przy chłodzeniu dodaje się do roztworu 207,8 g /5,19 mola/ wodorotlenku sodowego i 350,4 g /2,52 mola/ kwasu monobromooctowego. Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się pod chłodnicą zwrotną w stanie wrzenia w ciągu 20 minut, a

następnie odparowuje się rozpuszczalnik do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w 1940 ml wody i roztwór zakwasza stężonym kwasem solnym do wartości pH=3. Mieszaninę reakcyjną chłodzi się i miesza w ciągu 2 godzin, po czym odsącza wydzielone kryształy. Otrzymuje się 419 g surowego produktu. Po rekrytalizacji z mieszaniny chloroformu i n-heksanu otrzymuje się kwas III-rzęd.-butylooksykarbonyloaminooksyoctowy w ilości 388,8 g /86%/. o temperaturze topnienia 115—116°C.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_7H_{12}NO_5$ /191,18/ obliczono — C:44,0%, H:6,8%, N:7,2%, oznaczono — C:43,9%, H:6,9%, N:7,1%.

Etap 2. BOC-OGli-Tyr-Ser-Met-N₂H₂

1,72 g /9,0 mmoli/ BOC-OGli i 4,5 g /10,0 mmoli/ Tyr-Ser-Met-OCH₃. HCl rozpuszcza się w 10 ml dwumetyloformamidu i po ochłodzeniu roztworu do temperatury 0°C dodaje się 1,11 ml /10 mmoli/ N-metylomorfoliny i 1,85 g /9,0 mmoli/ dwucykloheksylokarbodwuimidu /DCC/. Mieszaninę reakcyjną miesza się w temperaturze 0°C w ciągu godziny, a następnie pozostawia w temperaturze pokojowej do następnego dnia. Wydzielony dwucykloheksylo-mocznik /DCU/ odsącza się, przesącza odparowuje do sucha, a otrzymaną pozostałość rozpuszcza się w 200 ml octanu etylu. Uzyskany roztwór przemywa się dwukrotnie 1n kwasem solnym /2×100 ml/ i dwukrotnie 8% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego /2×100 ml/, po czym suszy się i odparowuje do sucha. Otrzymany, surowy ester metyloowy podstawionego i chronionego tetrapeptydu w ilości 4,5 g rozpuszcza się w 45 ml metanolu, do roztworu dodaje się 1,26 ml /26,0 mmoli/ wodoru hydrazyny i całość pozostawia do następnego dnia w temperaturze pokojowej. Po tym czasie roztwór odparowuje się do sucha, a do otrzymanej pozostałości dodaje się octan etylu. Wydzielony osad odsącza się, przemywa octanem etylu i eterem, a następnie suszy nad stężonym kwasem siarkowym. Otrzymuje się 3,30 g /62,5%/. odpowiednio podstawionego i chronionego tetrapeptydu w postaci hydrazyny. Po rekrytalizacji z wody związek wykazuje temperaturę topnienia 137°C, $R'_F=0,36$.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{24}H_{35}N_6O_6S$ /586,66/ obliczono — C:49,1%, H:6,5%, N:14,4%, oznaczono — C:49,0%, H:6,6%, N:14,4%.

Etap 3. BOC-OGli-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli.HCl

0,41 g /0,70 mmola/ BOC-OGli-Tyr-Ser-Met-N₂H₂ rozpuszcza się w 5 ml dwumetyloformamidu, roztwór oziębia się do temperatury -20°C, a następnie dodaje się kroplami 4,4n roztwór chlorowodoru w octanie etylu w ilości 0,64 ml /2,8 mmola/. Po zakończeniu wkraplania dodaje się 0,105 ml /0,85 mmola/ azotynu III-rzęd.-butylowego i całość miesza w ciągu 5 minut w temperaturze -10°C.

Po ponownym oziębieniu roztworu do temperatury -20°C dodaje się następnie 0,96 g /0,70 mmola/ Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli /patrz brytyjski opis patentowy nr 1 201 053/ i 0,48 ml /2,8 mmola/ dwuizopropylloaminy rozpuszczonej uprzednio w 8 ml dwumetyloformamidu. Zawartość naczynia miesza się w ciągu 1 godziny w temperaturze -5—0°C i pozo-

stawia w temperaturze 0°C do następnego dnia. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną odparowuje się do sucha, a pozostałość zadaje 8% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego. Osad odsącza się, przemywa wodą i suszy. Otrzymany, podstawiony i chroniony tetradekapeptyd w ilości 0,93 g /69%/ zawieszają się w 6 ml metanolu. Do zawiesiny dodaje się mieszaninę 1,35 ml pirydyny i 1,35 ml stężonego kwasu solnego. Uzyskany roztwór rozcieńcza się 50 ml wody, a wydzielony osad w postaci chlorowodoru odsącza się, przemywa wodą i suszy. Otrzymuje się 0,78 g /57%/ produktu o temperaturze topnienia 202–204°C i ogólnym wzorze $C_{90}H_{132}N_{21}O_{24}ClS$ /1959,66/.

Etap 4. BOC-OGli-Tyr-Ser-Met/Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal/Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr/But^t-Pro-Asp/OBu^t-Ala-Gli-Glu/OBu^t-OBu^t-3HCl.

0,345 g /0,176 mmola/ BOC-OGli-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli. HCl, 0,400 g /0,176 mmola /Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr/But^t-Pro-Asp/OBu^t-Ala-Gli-Glu/OBu^t-OBu^t.

3 HCl /patrz brytyjski opis patentowy nr 1 201 053/ i 0,281 g /1,05 mmola/ PCPOH rozpuszcza się w 3,3 ml dwumetyloformamidu, a następnie dodaje się 0,025 ml /0,18 mmola/ trójtetyloaminy i 0,074 g /0,36 mmola/ DCC. Po przetrzymaniu mieszaniny reakcyjnej w temperaturze pokojowej w ciągu dwóch dni wydzielony DCU odsącza się, a przesącz rozcieńcza 30 ml eteru. Wydzielony osad odsącza się, przemywa eterem i suszy. Otrzymuje się 0,640 g /87%/ produktu o wzorze $C_{194}H_{311}N_{44}O_{49}Cl_3S$ /4182,29/, o temperaturze topnienia 208–212°C i $R_f^s=0,22$.

Przykład II. OAla-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-Wal-Tyr-Pro-Asp-Ala-Gli-Glu.

0,600 g /0,142 mmola/ BOC-OAla-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr/But^t-Pro-Asp/OBu^t-Ala-Gli-Glu/OBu^t-OBu^t. 3 HCl rozpuszcza się w mieszaninie 4,8 ml kwasu trójfluorooctowego, 0,6 ml wody i 0,6 ml anizolu. Roztwór pozostawia się na godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie rozcieńcza się 60 ml eteru. Wydzielony osad odsącza się, przemywa eterem i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem nad pięciotlenkiem fosforu i wodorotlenkiem potasowym. Otrzymuje się 0,532 g /86,5%/ podstawionego okta-kozapeptydu w postaci trójfluorooctanu.

Produkt ten rozpuszcza się w 10 ml wody i jony trójfluorooctanowe wymienia się na jony octanowe stosując żywicę jonowymienną Dowex 1×8 w formie octanowej. Otrzymany roztwór nanosi się następnie na kolumnę z wymienniczym jonowym Whatman GM-52 i eluuje za pomocą roztworów buforowych — 0,01 molarne /pH=4,5/ i 0,4 molarne /pH=6,7/ octanu amonu. Właściwe reakcje łączy się i liofilizuje. Otrzymuje się 0,23 g /42%/ produktu o zawartości peptydu=85,1%, zawartości Met-sulfotlenku 2,7% i stosunku Tyr/Trp=2,1.

Analiza zawartości aminokwasów /teoretyczne wartości w nawiasie/.

Liz: 3,89 /4/, His: 0,97 /1/, Arg: 3,00 /3/, Asp: 1,10 /1/, Ser: 0,97 /1/, Glu: 1,94 /2/, Pro: 3,10 /3/, Gli: 3,06 /3/, Ala: 1,15 /1/, Wal: 2,84 /3/, Met: 0,68 /1/, Tyr: 1,94 /2/, Fen: 1,06 /1/.

Podstawiony i chroniony trójchlorowodorek okta-kozapeptydu użyty jako związek wyjściowy otrzymuje się w sposób następujący:

10 Etap 1. Kwas III-rzęd.-butyloksykarbonylo-1-α-aminooksypionowy /BOC-OAla/

4,0 g /29 mmoli/ kwasu D-α-bromopropionowego poddaje się działaniu 3,62 g /65 mmoli/ wodorotlenku potasowego i 4,39 g /33 mmola/ III-rzęd.-butyloksykarbonylohydroksyloaminy jak podano w przykładzie I, etap 1. Otrzymany surowy produkt rozpuszcza się w eterze, a następnie dodaje się 6,3 ml /32 mmole/ dwucykloheksyloaminy.

Otrzymuje się tym sposobem 6,7 g /60%/ kwasu III-rzęd.-butyloksykarbonylo-L-α-aminooksypionowego w postaci dwucykloheksyloaminowej soli o temperaturze topnienia 157°C. Związek ten zawieszają się w eterze, wytrząsają z 0,2 n kwasem siarkowym, a następnie fazę eterową odparowuje się do sucha. Otrzymuje się 3,05 g /50%/ produktu o temperaturze topnienia 110–112°C. $[\alpha]_D^{20} = -91^\circ$ /c=1 w etanolu/.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_8H_{15}NO_5$ /N=205,21/ obliczono: C: 46,4%, H: 7,4%, N: 6,8%, oznaczono — C: 46,6%, H: 7,5%, N: 6,8%.

Etap 2. BOC-OAla-Tyr-Ser-Met-N₂H₃

1,44 g /7,0 mmoli/ BOC-OAla i 3,50 g /7,8 mmola/ Tyr-Ser-Met-OCH₃. HCl rozpuszcza się w 12 ml dwumetyloformamidu. Roztwór chłodzi się do temperatury 0°C, a następnie dodaje się 0,85 ml /7,8 mmola/ N-metylomorfoliny i 1,48 g /7,2 mmola/ DCC. Po godzinnym mieszaniu w temperaturze 0°C pozostawia się mieszaninę reakcyjną w temperaturze pokojowej do następnego dnia, po czym odparowuje się metanol, a pozostałość zadaje się octanem etylu. Wydzielony osad odsącza się, przemywa octanem etylu i eterem, a następnie suszy nad stężonym kwasem siarkowym.

Otrzymuje się 2,1 g /50%/ produktu, który po rekryształizacji z wody topnieje w 147°C. $R_f^1=0,43$.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{26}H_{46}N_6O_6S$ /M=600,69/ obliczono — C: 50,0%, H: 6,7%, oznaczono — C: 49,6%, H: 6,7%.

Etap 3. BOC-OAla-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli. HCl

0,266 g /0,44 mmola/ BOC-OAla-Tyr-Ser-Met-N₂H₃ rozpuszcza się w 3,2 ml dwumetyloformamidu i po ochłodzeniu do temperatury —20°C dodaje się 0,41 ml /1,8 mmola/ 4,4n chlorowodoru w octanie etylu i 0,07 ml /0,59 mmola/ azotynu III-rzęd.-butylowego. Po 5 minutowym mieszaniu w temperaturze —10°C całość chłodzi się do temperatury —20°C, po czym dodaje się 0,600 g /0,438 mmola/ Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli i 0,31 ml /1,8 mmola/ dwuizopropylotyloaminy rozpuszczonej uprzednio w 5 ml dwumetyloformamidu. Po godzinnym mieszaniu w temperaturze —5–0°C całość pozostawia się do następnego dnia w temperaturze 0°C. Po odparowaniu dwumetyloformamidu pozostałość zadaje się

8% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego, a wydzielony osad odsącza się, przemywa wodą i suszy. Otrzymany podstawiony i chroniony tetradeka-peptyd w ilości 0,70 g /81% zawieszają się w 5 ml metanolu, po czym dodaje się mieszaninę 1 ml stężonego kwasu solnego i 1 ml pirydyny. Następnie roztwór rozcieńcza się 50 ml wody, a wydzielony osad odsącza, przemywa wodą i suszy. Otrzymuje się gotowy produkt o wzorze $C_{21}H_{34}N_{21}O_{24}ClS$ /1973,68/ o temperaturze topnienia 200—202°C. $R_f^2=0,19$.

Etap 4. BOC-OAla-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz-/BOC/-Liz-/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-/BOC/-Wal-Tyr-/Bu^t-Pro-Asp-/OBu^t-Ala-Gli-Glu/OBu^t-OBu^t. 3 HCl

0,348 g /0,176 mmola/ BOC-OAla-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-/BOC/-Pro-Wal-Gli-HCl, 0,400 g /0,176 mmola/ Liz/BOC/-Liz-/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-/BOC/-Wal-Tyr-/Bu^t-Pro-Asp-/OBu^t-Ala-Gli-Glu/OBu^t-OBu^t. 3 HCl i 0,281 g /1,05 mmola/ PCPOH rozpuszcza się w 3,3 ml dwumetyloformamidu, po czym do roztworu dodaje się 0,025 ml /0,18 mmola/ trójetylaminy i 0,074 g /0,36 mmola/ DCC. Mieszaninę reakcyjną pozostawia się w ciągu dwóch dni w temperaturze pokojowej. Wydzielony osad DCU odsącza się, a przesącz rozcieńcza się 30 ml eteru. Wydzielony osad gotowego produktu odsącza się, przemywa eterem i suszy. Uzyskuje się 0,658 g /89% związku o wzorze $C_{195}H_{319}N_{44}O_{49}Cl_3S$ /4196,36/ o temperaturze topnienia 175—177°C. $R_f^2=0,25$.

Przykład III. D-OAla-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-Wal-Tyr-Pro-Asp-Ala-Gli-Glu

0,600 g /0,142 mmola/ BOC-D-OAla-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz-/BOC/-Liz-/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-/BOC/-Wal-Tyr-/Bu^t-Pro-Asp-/OBu^t-Ala-Gli-Glu-/OBu^t-OBu^t. 3 HCl rozpuszcza się w mieszaninie 4,8 ml kwasu trójfłurooctowego, 0,6 ml wody i 0,6 ml anizolu, a następnie pozostawia na godzinę w temperaturze pokojowej. Po rozcieńczeniu 60 ml eteru wydzielony osad odsącza się, przemywa eterem i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem nad pięciotlenkiem fosforu i wodorotlenkiem potasu.

Otrzymuje się 0,546 g /88,5% podstawionego okta-koza-peptydu w postaci trójfłurooctanu, który rozpuszcza się w 10 ml wody i przeprowadza w octan za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex 1×8 w postaci octanowej.

Otrzymany roztwór wprowadza się na kolumnę wypełnioną wymiennicem jonowym Whatman CM—52 i eluuje za pomocą roztworów buforowych — 0,01 molarne /pH—4,5/ i 0,4 molarne /pH—6,7/ octanu amonu. Po połączeniu właściwych frakcji poddaje się je procesowi liofilizacji. Uzyskuje się 0,245 g /39% produktu o zawartości peptydu=75%. Oznaczenie wykonane za pomocą absorpcji w nadfiolecie wykazało zawartość Met-sulfotlenku=2,57% i stosunek Tyr/Trp=2,07.

Analiza zawartości aminokwasów /teoretyczne wartości w nawiasach/:

Liz: 4,35 /4/, His: 0,97 /1/, Arg: 3,13 /3/, Asp: 1,06 /1/, Ser: 1,00 /1/, Glu: 1,92 /2/, Pro: 2,90 /3/, Gli:

3,00 /3/, Ala: 1,00 /1 /, Wal: 2,92 /3/, Met: 0,87 /1/, Tyr: 2,21 /2/, Fen: 1,06 /1/.

Trójklorowodorek podstawionego i chronionego okta-koza-peptydu jako związek wyjściowy otrzymuje się w sposób następujący:

Etap 1. Kwas III-rzęd.-butylooksykarbonylo-D-α-aminooksypropionowy /BOC-D-OAla/.

7,04 g /51 mmoli/ kwasu L-α-bromopropionowego poddaje się działaniu 6,3 g /112 mmoli/ wodorotlenku potasowego i 7,71 g /58 mmoli/ III-rzęd.-butylooksykarbonylohydroksyloaminy, jak podano w przykładzie I etap 1. Surowy produkt rozpuszcza się w eterze, a następnie dodaje się 11,0 ml /56 mmoli/ dwucykloheksyloaminy.

Tym sposobem otrzymuje się 14,85 g /75% kwasu III-rzęd.-butylooksykarbonylo-D-α-bromopropionowego w postaci dwucykloheksyloaminowej soli o temperaturze topnienia 157°C. Związek ten zawieszają się w eterze, wytrząsają z 0,2n roztworem kwasu siarkowego i fazę eterową po jej oddzieleniu odparowuje się do sucha. Otrzymuje się 6,55 g /62% produktu o wzorze $C_8H_{15}NO_5$ /205,21/ i temperaturze topnienia 110—111°C. $[\alpha]_D^{25}=+90,0^\circ$ /c=1 w etanolu/.

Etap 2. BOC-D-OAla-Tyr-Ser-Met-N₂H₃

1,85 g /9,0 mmoli/ BOC-D-OAla i 4,50 g /10 mmoli/ Tyr-Ser-Met-OCH₃. HCl rozpuszcza się w 15 ml dwumetyloformamidu, roztwór chłodzi się do temperatury 0°C, a następnie dodaje się 1,11 ml /10 mmoli/ N-metylomorfoliny i 1,90 g /9,2 mmola/ DCC. Po godzinnym mieszanym w temperaturze 0°C pozostawia się mieszaninę reakcyjną do następnego dnia w temperaturze pokojowej. Wydzielony w tym czasie DCU odsącza się, przesącz odparowuje do sucha, a uzyskaną pozostałość rozpuszcza się w 200 ml octanu etylu. Roztwór ten wytrząsają się dwukrotnie z 1n kwasem solnym /2×100 ml/ i dwukrotnie z 8% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego /2×100 ml/, a następnie suszy się i odparowuje.

Otrzymuje się 3,65 g żelowatej pozostałości, którą rozpuszcza się w 40 ml metanolu, a następnie dodaje 1,02 ml /21,2 mmola/ wodzianu hydrazyny i pozostawia do następnego dnia w temperaturze pokojowej. Po tym czasie odparowuje się metanol, a pozostałość rozciera z octanem etylu, osad odsącza, przemywa octanem etylu i eterem, a następnie suszy nad stężonym kwasem siarkowym. Otrzymuje się 1,90 g /35% produktu, który po rekryształizacji z wody ma temperaturę topnienia 184—185°C. $R_f^1=0,43$.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{25}H_{40}N_6O_9S$ /600,69/ obliczono — C: 50,0%, H: 6,7%, N: 14,0%, oznaczono — C: 49,6%, H: 6,68%, N: 14,1%.

Etap 3. BOC-D-OAla-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-/BOC/-Pro-Wal-Gli. HCl

0,381 g /0,635 mmola/ BOC-D-OAla-Tyr-Ser-Met-N₂H₃ rozpuszcza się w 4,5 ml dwumetyloformamidu i po ochłodzeniu do temperatury —20°C, przy mieszanym dodaje się kroplami 0,58 ml /2,65 mmola/ 4,4n roztworu chlorowodoru w octanie etylu oraz 0,095 ml /0,80 mmola/ azotynu III-rzęd.-butylowego. Po mieszanym w temperaturze —10°C w ciągu 5 minut mieszaninę reakcyjną chłodzi się ponownie do temperatury —20°C, po czym dodaje

się roztwór 0,86 g /0,628 mmola/ Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli i 0,43 ml /2,50 mmola/ dwuizopropyletyloaminy w 7,2 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się w ciągu godziny w temperaturze od -5 do 0°C, a następnie pozostawia do następnego dnia w temperaturze 0°C. Po tym czasie dwumetyloformamid odparowuje się, a pozostałość wytrząsa z 8% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego.

Osad odsącza się, przemywa wodą i suszy. Otrzymany, podstawiony i chroniony tetradekapeptyd w ilości 0,95 g /77% zawieszają się w 6 ml metanolu i do zawiesiny dodaje się mieszaninę 1,35 ml stężonego kwasu solnego i 1,35 ml pirydyny. Następnie powstały roztwór rozcieńcza się 50 ml wody.

Wydzielony osad odsącza się, przemywa wodą i suszy. Otrzymuje się 0,78 g /63% produktu o wzorze $C_{21}H_{34}N_{21}O_{24}$ CIS /1973,68/ o temperaturze topnienia 204—210°C i $R_f^2=0,20$.

Etap 4. BOC-D-OAla-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz-/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-/Bu^t/-Pro-Asp/OBu^t/-Ala-Gli-Glu-/OBu^t/-OBu^t. 3 HCl.

0,348 g /0,176 mmola/ BOC-D-OAla-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli. HCl, 0,400 g /0,176 mmola/ Liz/BOC/-Liz-/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-/Bu^t/-Pro-Asp/OBu^t/-Ala-Gli-Glu-/OBu^t/-OBu^t. 3 HCl i 0,281 g /1,05 mmola/ PCPOH rozpuszcza się w 3,3 ml dwumetyloformamidu, po czym do roztworu dodaje się 0,025 ml /0,18 mmola/ trójetyloaminy i 0,074 g /0,36 mmola/ DCC. Mieszaninę reakcyjną pozostawia się na okres dwóch dni w temperaturze pokojowej, po czym odsącza się wydzielony DCU, a przesącz rozcieńcza 30 ml eteru. Wydzielony osad odsącza się, przemywa eterem i suszy. Otrzymuje się 0,847 g /87,5% produktu o wzorze $C_{198}H_{313}N_{44}O_{46}Cl_6S$ /4196,32/ i temperaturze topnienia 166—187°C. $R_f^1=0,25$.

Przykład IV. OSer-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-Wal-Tyr-Pro-Asp-Ala-Gli-Glu.

0,68 g /0,142 mmola/ BOC-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Liz-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-/Bu^t/-Pro-Asp-/OBu^t/-Ala-Gli-Glu/OBu^t/-OBu^t. 3 HCl rozpuszcza się w mieszaninie 4,8 ml kwasu trójfluorooctowego, 0,6 ml wody i 0,6 ml anizolu, a następnie pozostawia całość w temperaturze pokojowej na godzinę. Po tym czasie dodaje się 60 ml eteru, a wydzielony osad sączy się, przemywa eterem i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem nad pięciotlenkiem fosforu i wodorotlenkiem potasowym. Otrzymany trójfluorooctan podstawionego oktakozapeptydu w ilości 0,400 g /65% rozpuszcza się w 8 ml wody, a następnie jony trójfluorooctanowe wymienia się na jony octanowe stosując żywicę jonowymienną Dowex 1×8 w octanowej postaci.

Roztwór zawierający peptyd w postaci octanu nanosi się następnie na kolumnę wypełnioną wypełniaczem jodowym Whatman CM—52 i eluuje za pomocą roztworów buforowych — 0,01 molarnego /pH—4,5/ i 0,4 molarnego /pH—6,7/ octanu amon-

nu. Zebrane, właściwe frakcje łączy się i poddaje procesowi liofilizacji. Otrzymuje się 0,240 g /41,5% produktu o zawartości peptydu=81,6% /oznaczenie wykonane w oparciu o absorpcję w nadfiolecie/, zawartości Met-sulfotlenku=4,4% i stosunku Tyr-/Trp=2,13.

Analiza zawartości aminokwasów /teoretyczne wartości w nawiasie/.

Liz: 3,92 /4/, His: 1,00 /1/, Arg: 3,15 /3/ Asp: 0,99 /1/, Ser: 0,83 /1/, Glu: 1,94 /2/, Pro: 3,00 /3/, Gli: 3,05 /3/, Ala: 1,04 /1/, Wal: 2,92 /3/, Met: 0,79 /1/, Tyr: 1,83 /2/, Fen: 0,97 /1/.

Trójchlorowodorek podstawionego i chronionego oktakozapeptydu, stosowany jako związek wyjściowy otrzymuje się sposobem opisanym poniżej.

Etap 1. Kwas t-butylooksykarbonylo-L-α-amino-oksy-β-benzylooksypropionowy.

48,4 g /0,364 mola/ III-rzęd.-butylooksykarbonylohydroksyloaminy, 40,7 g /0,728 mola/ wodorotlenku potasu i 94,0 g /0,364 mola/ kwasu DL-α-bromo-β-benzylooksypropionowego rozpuszcza się w 360 ml wody i miesza w ciągu trzech godzin w temperaturze pokojowej. Po zakwaszeniu do wartości pH 3 mieszaninę reakcyjną ekstrahuje się trzykrotnie eterem /3×720 ml/. Połączone fazy eterowe przemywa się wodą w ilości 720 ml i po osuszeniu środkiem suszącym dodaje się 78 ml /0,40 mola/ dwucykloheksyloaminy. Otrzymuje się sól dwucykloheksyloaminową kwasu III-rzęd.-butylooksykarbonylo-DL-α-amino-oksy-β-benzylooksypropionowego o temperaturze topnienia 144—146°C w ilości 43,61 g.

Produkt ten zawieszają się w 500 ml eteru, a następnie zawiesinę wytrząsa się pięciokrotnie z 0,2n roztworem kwasu siarkowego /5×100 ml/. Roztwór eterowy suszy się, a następnie odparowuje do sucha, po czym uzyskaną pozostałość rozpuszcza się w 700 ml etanolu i dodaje 6,56 g /48,5 mmola/ zasady /+/amfetaminy. Mieszaninę reakcyjną chłodzi się i pozostawia do następnego dnia. Wydzielone kryształy odsącza się, a lugi pokryształiczne odparowuje się uzyskując 9,33 g /16,5% końcowego produktu o wzorze $C_{15}H_{21}NO_6$ /311,34/ i temperaturze topnienia 95—97°C. $[\alpha]_D^{25}=-36^\circ$ w etanolu/.

Etap 2. Kwas III-rzęd.-butylooksykarbonylo-L-α-amino-oksy-β-hydroksypropionowy /BOC-OSer/ 5,0 g /16,1 mmola/ kwasu L-α-III-rzęd.-butylooksykarbonyloaminooksy-β-benzylooksypropionowego rozpuszcza się w 100 ml metanolu i roztwór poddaje się uwodornieniu w obecności 2,5 g 10% palladu na węglu aktywowanym jako katalizatora. Po trzech godzinach katalizator odsącza się, a przesącz odparowuje. Oleistą pozostałość zalewa się eterem naftowym i pozostawia w spokoju na kilka godzin. Wydzieloną substancję krystaliczną odsącza się i suszy. Otrzymuje się 3,2 g /90% produkt o wzorze $C_8H_{15}NO_6$ /221,22/, o temperaturze topnienia 94—95°C i $R_f^1=0,27$.

Etap 3. BOC-OSer-Tyr-Ser-Met-N₂H₂,

2,2 g /10 mmoli/ BOC-OSer- i 4,50 g /10 mmoli/ Tyr-Ser-Met-OCH₃. HCl rozpuszcza się w 15 ml dwumetyloformamidu, roztwór chłodzi się do temperatury 0°C, a następnie dodaje się 1,11 ml /10 mmoli/ N-metylomorfoliny i 1,90 g /9,2 mmola/

DCC. Po mieszanii w ciągu godziny w temperaturze 0°C, mieszaninę reakcyjną pozostawia się do następnego dnia w temperaturze pokojowej. Wydzielony osad DCU odsącza się, przesącza odparowuje, a uzyskaną pozostałość rozpuszcza się w 200 ml octanu etylu. Roztwór przemywa się dwukrotnie 1n kwasem solnym /2×100 ml/ i dwukrotnie 8% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego /2×100 ml/, po czym osusza i odparowuje do sucha. Otrzymany w ilości 3,7 g ester tetrapeptydu rozpuszcza się w 40 ml metanolu, dodaje 1,0 ml /20,4 mmola/ wodzianu hydrazyny i pozostawia w temperaturze pokojowej do następnego dnia. Po tym czasie metanol odparowuje się, a pozostałość rozciera z octanem etylu. Wydzielony osad odsącza się, przemywa octanem etylu i eterem, a następnie suszy nad stężonym kwasem siarkowym. Otrzymuje się 2,5 g /44% związku o temperaturze topnienia 141°C i $R_f^1=0,30$.

Analiza elementarna dla wzoru $C_{25}H_{40}N_6O_{10}S$ 616,69/ obliczono — C: 48,7%, H: 6,55%, N: 13,6%, S: 13,3%, S: 13,3%.

Etap 4. BOC-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli. HCl

0,274 g /0,446 mmola/ BOC-OSer-Tyr-Ser-Met-N₂H₅ rozpuszcza się w 3,2 ml dwumetyloformamidu i po ochłodzeniu roztworu do -20°C, mieszając dodaje się kroplami 0,41 ml /1,8 mmola/ 4,4n roztworu chlorowodoru w octanie etylu oraz 0,07 ml /0,59 mmola/ azotynu III-rzęd.-butylowego. Zawartość naczynia miesza się w ciągu 5 minut w temperaturze -10°C, ponownie chłodzi do temperatury -20°C i dodaje roztwór 0,600 g /0,438 mmola/ Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli i 0,31 ml /1,8 mmola/ dwuizopropyletyloaminy w 5 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu godziny w temperaturze od -5 do 0°C, a następnie pozostawia do następnego dnia w temperaturze 0°C.

Po tym czasie rozpuszczalnik odparowuje się, a pozostałość rozciera się z 8% wodnym roztworem wodorowęglanu sodu. Osad odsącza się, przemywa wodą i suszy. Otrzymuje się 0,69 g /79% podstawnego i chronionego tetradekapeptydu, który zawieszają się w 5 ml metanolu. Do zawiesiny dodaje się mieszaninę 1 ml stężonego kwasu solnego i 1 ml pirydyny, po czym uzyskany roztwór rozcieńcza się 50 ml wody i odsącza wydzielony osad. Po przemyciu osadu wodą i wysuszeniu otrzymuje się 0,471 g /54% produktu o wzorze $C_{81}H_{134}N_{21}O_{25}ClS$ /1989,68/, o temperaturze topnienia 198—202°C i $R_f^2=0,16$.

Etap 5. BOC-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr/But^t/-Pro-Asp/OBu^t/-Ala-Gli-Glu/OBu^t/-OBu^t. 3 HCl

0,350 g /0,176 mmola/ BOC-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli. HCl, 0,400 g /0,176 mmola/ Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr/But^t/-Pro-Asp/OBu^t/-Ala-Gli-Glu/OBu^t/-OBu^t. 3 HCl i 0,281 g /1,05 mmola/ PCPOH rozpuszcza się w 3,3 ml dwumetyloformamidu i dodaje się 0,025 ml /0,18 mmola/ trójetyloaminy, a następnie

0,074 g /0,36 mmola/ DCC. Mieszaninę reakcyjną pozostawia się w temperaturze pokojowej na dwa dni, po czym wydzielony DCU odsącza się, a przesącza rozcieńcza 30 ml eteru. Wydzielony produkt odsącza się, przemywa eterem i suszy. Otrzymuje się 0,659 g /88,5% związku o wzorze $C_{196}H_{318}N_{44}O_{50}Cl_3S$ /4212,33/, o temperaturze topnienia 160—166°C i $R_f^3=0,22$.

Przykład V. D-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-Wal-Tyr-Pro-Asp-Ala-Gli-Glu 0,600 g /0,142 mmola/ BOC-D-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t/-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz-/BOC/-Liz/BOC/Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-/But^t/-Pro-Asp-/OBu^t/-Ala-Gli-Glu/OBu^t/-OBu^t. 3 HCl rozpuszcza się w mieszaninie 4,8 ml kwasu trójfluorooctowego, 0,6 ml wody i 0,6 ml anizolu. Mieszaninę reakcyjną pozostawia się na godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie rozcieńcza 60 ml eteru.

Wydzielony osad odsącza się, przemywa eterem i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem nad pięciotlenkiem fosforu i wodorotlenkiem potasu. Otrzymuje się 0,533 g /86,5% trójfluorooctanu podstawionego oktaokzapeptydu. Związek ten rozpuszcza się w 10 ml wody, a następnie przeprowadza w octan stosując żywicę jonowymienną Dowex 1×8 w octanowej postaci. Uzyskany roztwór peptydu w postaci octanu wprowadza się na kolumnę z wymienniczym jonowym Whatman CM-52 i eluuje za pomocą roztworów buforowych — 0,01 molarne /pH=4,5/ i 0,4 molarne /pH=6,7/ octanu amonu. Właściwe frakcje zbiera się, łączy i poddaje procesowi liofilizacji. Otrzymuje się 0,250 g /43% produktu o zawartości peptydu=81,0% (oznaczenie wykonane w oparciu o absorpcję w nadfiolecie), zawartości Met-sulfotlenku=4,4% i stosunku Tyr/Trp=2,05.

Analiza zawartości aminokwasów /teoretyczne wartości w nawiasie/:

Liz: 3,76 /4/, His: 0,8 /1/, Arg: 3,05 /3/, Asp: 1,00 /1/, Ser: 0,73 /1/, Glu: 1,94 /2/, Pro: 3,00 /3/, Gli: 2,95 /3/, Ala: 1,05 /1/, Wal: 2,82 /3/, Met: 0,78 /1/, Tyr: 1,6 /2/, Fen: 0,83 /1/.

Trójchlorowodorek podstawionego i chronionego oktaokzapeptydu, stosowany jako związek wyjściowy otrzymuje się w sposób opisany poniżej.

Etap 1. Kwas III-rzęd.-butyloksykarbonylo-D-α-aminooksy-β-benzyloksypropionowy.

Sól /+-amfetaminową kwasu III-rzęd.-butyloksykarbonylo-D-α-aminooksy-β-benzyloksypropionowego otrzymana według przykładu IV etap 1 rekrytalizuje się z etanolu. Otrzymuje się 13,27 g czystej substancji o temperaturze topnienia 188—191°C i $[\alpha]_D^{20}=+54^\circ$ /c=0,5 w metanolu/. Po rozłożeniu uzyskuje się 7,9 g /14% soli kwasu III-rzęd.-butyloksykarbonylo-D-α-aminooksy-β-benzyloksypropionowego o temperaturze topnienia 96—98°C $[\alpha]_D^{20}=+38^\circ$ /c=1 w etanolu/.

Etap 2. Kwas III-rzęd.-butyloksykarbonylo-D-α-aminooksy-β-hydroksypropionowy /BOC-D-OSer/ 5,5 g /17,7 mmola/ kwasu D-α-III-rzęd.-butyloksykarbonyloaminooksy-β-benzyloksypropionowego rozpuszcza się w 110 ml metanolu i roztwór

poddaje się uwodornieniu w obecności 2,75 g 10% palladu na węglu aktywowanym jako katalizatora. Po trzech godzinach reakcji katalizator odsącza się, przesącz odparowuje, a oleistą pozostałość zadaje się eterem naftowym. Wydzieloną po kilku godzinach krystaliczną substancję odsącza się i suszy. Otrzymuje się 3,65 g /96% kwasu D- α -III-rzęd.-butylooksykarbonyloaminooksy- β -hydroksypropionowego o wzorze $C_8H_{15}NO_6$ /221,22/ o temperaturze topnienia 94–95°C i $R_f^1=0,27$.

Etap 3. BOC-D-OSer-Tyr-Ser-Met- N_2H_3

4,4 g /20 mmoli/ BOC-D-OSer- i 9,0 g /20 mmoli/ Tyr-Ser-Met-OCH₃ rozpuszcza się w 30 ml dwumetyloformamidu. Po ochłodzeniu roztworu do temperatury 0°C dodaje się 2,22 ml /20 mmoli/ N-metylomorfoliny i 3,8 g /18,4 mmola DCC. Po mieszanii w ciągu godziny w temperaturze 0°C mieszaninę reakcyjną pozostawia się do następnego dnia w temperaturze pokojowej.

Wydzielony DCU odsącza się, a przesącz odparowuje do sucha. Otrzymaną pozostałość rozpuszcza się w 400 ml octanu etylu, uzyskany roztwór przemywa dwukrotnie 1n kwasu solnym /2×100 ml/ i dwukrotnie 8% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego /2×100 ml/, po czym suszy się i odparowuje do sucha. Otrzymane 8,10 g estru podstawionego i chronionego tetrapeptydu rozpuszcza się w 85 ml metanolu, dodaje 2,2 ml /46 mmoli/ wodnian hydrazyny i mieszaninę reakcyjną pozostawia w temperaturze pokojowej do następnego dnia. Po tym czasie metanol odparowuje się, pozostałość rozciera z octanem etylu, a wydzielony osad odsącza się, przemywa octanem etylu i eterem, a następnie suszy nad stężonym kwasem siarkowym. Otrzymuje się 7,21 g /63% produktu, który po rekrystalizacji z wody ma temperaturę topnienia 174–175°C i $R_f^1=0,30$.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{28}H_{40}N_6O_{10}S$ /616,69/ obliczono — C: 48,7%, H: 6,55%, N:13,6%, oznaczono — C: 48,3%, H: 6,6%, N: 13,8%.

Etap 4. BOC-D-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli- HCl 1,25 g /2,13 mmola/ BOC-D-OSer-Tyr-Ser-Met- N_2H_3 rozpuszcza się w 15 ml dwumetyloformamidu, roztwór chłodzi się do temperatury –20°C, a następnie mieszając dodaje się kroplami 2,08 ml /8,32 mmola/ 4n roztworu chlorowodoru w octanie etylu i 0,32 ml /2,70 mmola/ azotynu III-rzęd.-butylowego. Po mieszanii w temperaturze –10°C w ciągu 5 minut, mieszaninę reakcyjną chłodzi się ponownie do temperatury –20°C, a następnie dodaje roztwór 2,78 g Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli i 1,4 ml /8,13 mmola/ dwuizopropyletyloaminy w 23 ml dwumetyloformamidu, miesza się w ciągu godziny w temperaturze od –5 do 0°C i pozostawia w temperaturze pokojowej do następnego dnia.

Po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość rozciera się z 8% wodnym roztworem wodorowęglanu sodu, wydzielony osad odsącza się, przemywa wodą i suszy. Otrzymuje się 3,49 g /94% podstawionego i chronionego tetradekapeptydu, który zawieszają w 24 ml metanolu, po czym dodaje się mieszaninę 4,75 ml stężonego kwasu solnego i 4,75 ml pirydyny. Otrzymany roztwór rozcieńcza się

240 ml wody, a wydzielony osad odsącza się przemywa wodą i suszy. Otrzymuje się 2,95 g /73% produktu o wzorze $C_{91}H_{134}N_{21}O_{25}ClS$ /1989,68/ o temperaturze topnienia 200–202°C i $R_f^2=0,25$.

5 Etap 5. BOC-D-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu-/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz-/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr/Bu^t-Pro-Asp/OBu^t-Ala-Gli-Glu/OBu^t-OBu^t . 3 HCl

10 0,350 g /0,176 mmola/ BOC-D-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli . HCl, 0,400 g /0,176 mmola/ Liz/BOC/-Liz-/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr/Bu^t-Pro-Asp/OBu^t-Ala-Gli-Glu/OBu^t-OBu^t . 3 HCl i 15 0,281 g /1,05 mmola/ PCPCH rozpuszcza się w 3,3 ml dwumetyloformamidu, a następnie dodaje się 0,025 ml /0,18 mmola/ trójetyleaminy i 0,074 g /0,36 mmola/ DCC. Mieszaninę reakcyjną pozostawia się w ciągu dwóch dni w temperaturze pokojowej, odsącza wydzielony osad DCU, a przesącz rozcieńcza 30 ml eteru. Wydzielony za pomocą eteru produkt odsącza się, przemywa eterem i suszy. Otrzymuje się 0,673 g /90,7% związku o wzorze $C_{195}H_{313}N_{44}O_{50}Cl_3S$ /4212,33/, o temperaturze topnienia 158–162°C i $R_f^3=0,25$.

25 Przykład VI. D-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-Wal-Tyr-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala

30 1,00 g /0,214 mmola/ BOC-D-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr/Bu^t-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu-/OBu^t-Asp/OBu^t-Glu-Ser-Ala-OBu^t . 3 HCl rozpuszcza się w mieszaninie 8 ml kwasu trifluorooctowego, 1 ml wody i 1 ml anizolu, po czym roztwór pozostawia się na godzinę w temperaturze pokojowej a następnie rozcieńcza 200 ml eteru. Wydzielony osad odsącza się, przemywa eterem i suszy 40 pod zmniejszonym ciśnieniem nad pięciotlenkiem fosforu i wodorotlenkiem potasowym.

Otrzymuje się 0,90 g /88% trójklorooctanu podstawionego dotriakontapeptydu, który po rozpuszczeniu w 20 ml wody przeprowadza się w octan za pomocą wymienniczą jonowego Dowex 1×8 w octanowej postaci. Uzyskany roztwór wprowadza się następnie na kolumnę z wymienniczą jonowym Whatman OM-52 i eluuje za pomocą roztworów buforowych, a mianowicie 0,01 molarnego /pH-4,5/ i 0,4 molarnego /pH-6,7/ octanu amonu. Właściwe, zebrane frakcje łączy się i poddaje procesowi liofilizacji. Otrzymuje się 0,46 g /46% produktu.

50 Trójklorowodorek podstawionego i chronionego dotriakontapeptydu, stosowany jako związek wyjściowy otrzymuje się w sposób opisany poniżej.

Etap 1. Z-Glu/OBu^t-Ser-Ala-OBu^t

23,9 g /100 mmoli/ Z-Ser i 14,5 g /100 mmoli/ Ala-OBu^t rozpuszcza się w 150 ml chlorku metylenu, po czym po ochłodzeniu roztworu do temperatury –10°C wkrapla się 20,6 g /100 mmoli/ DCC rozpuszczonego w 100 ml chlorku metylenu. Zawartość naczynia miesza się w ciągu 2 godzin w temperaturze 0°C, a następnie pozostawia w temperaturze pokojowej do następnego dnia. Wydzielony osad DCU odsącza się, a przesącz przemywa

się trzykrotnie 1n kwasem solnym /3×70 ml/ i trzykrotnie 5% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego /3×70 ml/. Oddzielną fazę organiczną suszy się i następnie odparowuje, po czym oleistą pozostałość rozpuszcza się w 50 ml octanu etylu i pozostawia na 4 godziny w temperaturze 0°C. Wydzielony DCU odsącza się, przesącza ponownie odparowuje, a oleistą pozostałość zadaje się n-heksanem. Otrzymany tym sposobem surowy Z-Ser-Ala-OBu^t w ilości 30,0 g /82% rozpuszcza się w 600 ml metanolu i poddaje się roztwór uwodornieniu w obecności 2 g 10% palladu na węglu aktywowanym jako katalizatora. Po zakończeniu reakcji katalizator odsącza się, a przesącza odparowuje się do sucha. Otrzymany Ser-Ala-OBu^t rozpuszcza się w 220 ml octanu etylu i do roztworu dodaje się 33,0 g /76 mmoli/ Z-Glu/OBu^t/-ONSu. Następnego dnia mieszaninę reakcyjną przemawia się trzykrotnie 1n kwasem solnym /3×50 ml/ i trzykrotnie wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego /3×50 ml/, suszy się i odparowuje, a uzyskaną pozostałość rozciera się z eterem naftowym. Surowy produkt rozpuszcza się w octanie etylu i wytrąca oczyszczony związek przez dodanie eteru naftowego. Otrzymuje się 31,5 g /75% związku o temperaturze topnienia 72–74°C i $R_f^4=0,6$.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{27}H_{44}N_3O_9$ /551,84/ obliczono — C: 58,8%, H: 7,5%, N: 7,65%, oznaczono — C: 58,8%, H: 7,7%, N: 7,8%.

Etap 2. Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t

16,0 g /29,0 mmoli/ Z-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t rozpuszcza się w 350 ml metanolu i roztwór poddaje się uwodornieniu w obecności 1,6 g 10% palladu na węglu aktywowanym jako katalizatora. Po zakończeniu reakcji katalizator odsącza się i po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość rekrytalizuje się z mieszaniny metanolu i eteru. Otrzymuje się 9,06 g /75% związku o temperaturze topnienia 135–136°C, $[\alpha]_D^{25}=-25,9^\circ$ /c=1 w etanolu/ i $R_f^4=0,15$.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{19}H_{35}N_3O_7$ /417,80/ obliczono — C: 54,6%, H: 8,5%, N: 10,1%, oznaczono — C: 54,5%, H: 8,4%, N: 9,8%.

Etap 3. Z-Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t

8,2 g /19,6 mmola/ Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t i 8,0 g /19,0 mmoli/ Z-Asp/OBu^t/-ONSu rozpuszcza się w 80 ml octanu etylu i pozostawia roztwór do następnego dnia. Następnie roztwór przemawia się trzykrotnie 1n kwasem solnym /3×20 ml/ i trzykrotnie 5% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego /3×20 ml/, suszy się i odparowuje, pozostałość rozciera z eterem naftowym. Otrzymuje się 12,08 g /85,5% związku o temperaturze topnienia 85–87°C i $R_f^4=0,55$.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{35}H_{54}N_4O_{12}$ /722,81/ obliczono — N: 7,3%, oznaczono — N: 7,8%.

Etap 4. Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t

10,5 g /14,5 mmola/ Z-Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t rozpuszcza się w 130 ml metanolu i roztwór poddaje się uwodornieniu w obecności 1 g 10% palladu na węglu aktywowanym jako katalizatora. Po zakończeniu reakcji katalizator odsącza się, odparowuje rozpuszczalnik, a pozostałość zawiesza się w eterze naftowym i sączy. Otrzy-

muje się 8,35 g /97,5% związku o wzorze $C_{27}H_{48}N_4O_{10}$ /588,68/ o temperaturze topnienia 80–81°C, $[\alpha]_D^{25}=-24,3^\circ$ /c=1 w etanolu/ i $R_f^4=0,1$.

Etap 5. Z-Glu/OBu^t/-Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t

5,0 g /11,5 mmola/ Z-Glu/OBu^t/-ONSu i 6,60 g /11,2 mmola/ Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t rozpuszcza się w 100 ml chloroformu i pozostawia do następnego dnia. Roztwór przemawia się trzykrotnie 1n kwasem solnym /3×30 ml/ i trzykrotnie 5% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego /3×30 ml/, po czym roztwór suszy się, odparowuje chloroform, a żelowatą pozostałość rozciera z eterem naftowym. Otrzymany surowy produkt rozpuszcza się w octanie etylu i wytrąca oczyszczony związek przez dodanie eteru naftowego. Otrzymuje się 8,45 g /83% preparatu o temperaturze topnienia 168–169°C, $[\alpha]_D^{25}=-29,0^\circ$ /c=1 w etanolu/ i $R_f^4=0,5$.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{44}H_{69}N_5O_{15}$ /908,07/ obliczono — C: 58,2%, H: 7,7%, N: 7,7%, oznaczono — C: 58,4%, H: 7,7%, N: 7,5%.

Etap 6. Glu/OBu^t/-Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t

8,0 g /8,8 mmola/ Z-Glu/OBu^t/-Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t rozpuszcza się w 160 ml metanolu i roztwór poddaje się uwodornieniu w obecności 1 g 10% palladu na węglu aktywowanym jako katalizatora. Po zakończeniu reakcji katalizator odsącza się, roztwór odparowuje, a pozostałość zawiesza w mieszaninie eteru etylowego i eteru naftowego. Wydzielony osad odsącza się. Otrzymuje się 6,40 g związku o temperaturze topnienia 136–138°C, $[\alpha]_D^{25}=-29,7^\circ$ /c=1 w etanolu/, $R_f^5=0,1$ i wzorze ogólnym $C_{36}H_{58}N_5O_{18}$ /773,94/.

Etap 7. Z-Ala-Glu/OBu^t/-Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t

5,20 g /6,7 mmola/ Glu/OBu^t/-Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t i 2,15 g /6,7 mmola/ Z-Ala-ONSu rozpuszcza się w 50 ml chloroformu i pozostawia do następnego dnia. Po tym czasie roztwór przemawia się trzykrotnie 1n kwasem solnym /3×10 ml/ i trzykrotnie 5% wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego /3×10 ml/, po czym suszy się i odparowuje. Otrzymaną żelowatą pozostałość rozciera się z eterem naftowym. Otrzymuje się 6,10 g /93% związku o wzorze $C_{47}H_{74}N_6O_{16}$ /979,14/ o temperaturze topnienia 194–195°C, $[\alpha]_D^{25}=-30,9^\circ$ /c=1 w etanolu/ i $R_f^5=0,5$.

Etap 8. Ala-Glu/OBu^t/-Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t

6,10 g /6,2 mmola/ Z-Ala-Glu/OBu^t/-Asp/OBu^t/-Glu/OBu^t/-Ser-Ala-OBu^t rozpuszcza się w 120 ml metanolu i roztwór poddaje się uwodornieniu w obecności 1 g 10% palladu na węglu aktywowanym jako katalizatora. Po zakończeniu reakcji katalizator odsącza się, a krystaliczną pozostałość rekrytalizuje się z mieszaniny etanolu i eteru. Otrzymuje się 4,35 g /83% związku o temperaturze topnienia 192–194°C oraz $R_f^5=0,25$, $R_f^1=0,1$ i $R_f^2=0,65$.

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{39}H_{68}N_6O_{14}$ 2,45 g /13,3 mmola/ PFPOH, 1,31 g /4,02 mmola/ oznaczono — C: 55,2%, H: 7,8%, N: 9,6%.

Etap 9. Z-Asn-Gli-Ala-Glu/OBu^t-Asp/OBu^t/ 2,45 g /13,3 mmola/ PFPOH, 1,31 g /4,02 mmola/ Z-Asn-Gli i 3,40 g /4,02 mmola/ Ala-Glu/OBu^t-Asp/OBu^t-Glu/OBu^t-Ser-Ala-OBu^t rozpuszcza się w 24 ml suchego dwumetyloformamidu, roztwór chłodzi się do temperatury 0°C, po czym dodaje się 0,915 g /4,43 mmola/ DCC. Zawartość naczynia miesza się w temperaturze 0°C w ciągu 30 minut, następnie w temperaturze pokojowej w ciągu 2,5 godziny, po czym odsącza się wydzielony DCU, a przesącz odparowuje do sucha. Otrzymaną pozostałość rozciera się z octanem etylu i odsącza. Surowy produkt ogrzewa się we wrzącym octanie etylu w ilości 20 ml, odsącza, przemywa dwukrotnie wrzącym octanem etylu /2×10 ml/ i suszy. Otrzymuje się 4,12 g /89,5%/ związku o ogólnym wzorze C₅₃H₈₃N₉O₁₉ /1150,30/, o temperaturze topnienia 200–201°C i R_f¹=0,60.

Etap 10. Asn-Gli-Ala-Glu/OBu^t-Asp/OBu^t-Glu/OBu^t-Ser-Ala-OBu^t

4,0 g /3,48 mmola/ Z-Asn-Gli-Ala-Glu/OBu^t-Asp/OBu^t-Ser-Ala-OBu^t rozpuszcza się w 140 ml metanolu i roztwór poddaje się uwodornieniu w obecności 0,5 g 10% palladu na węglu aktywowanym jako katalizatora. Po zakończeniu reakcji katalizator odsącza się, przesącz odparowuje do sucha, a pozostałość rozciera z eterem. Otrzymuje się 3,40 g /96%/ związku o ogólnym wzorze C₄₅H₇₇N₉O₁₇ /1016,17/, o temperaturze topnienia 188–190°C, [α]_D²⁰=–6,6° /c=0,89 w dwumetyloformamidzie/ i R_f²=0,5.

Etap 11. Z-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg/NO₂/-Arg/NO₂/-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-/But/-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu/OBu^t-Asp/OBu^t-Glu/OBu^t-Ser-Ala-OBu^t

3,0 g /2,95 mmola/ Asn-Gli-Ala-Glu/OBu^t-Asp/OBu^t-Glu/OBu^t-Ser-Ala-OBu^t i 5,46 g /2,95 mmola/ Z-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg/NO₂/-Arg/NO₂/-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr/OBu^t-Pro/ patrz brytyjski opis patentowy nr 1 201 053/ rozpuszcza się w 33 ml dwumetyloformamidu, chłodzi do temperatury 0°C, a następnie dodaje 3,35 g /4,42 mmola/ DCC–PFPOH – kompleks [J. Kovacs i współaut. J. Am. Chem. Soc. 89, 185, /1967/]. Po 15 minutach mieszania w temperaturze 0°C pozostawia się w ciągu 6 godzin w temperaturze pokojowej, a następnie odsącza wydzielony DCU i przesącz wlewa do 450 ml suchego eteru. Otrzymaną zawiesinę przechowuje się w chłodni do następnego dnia.

Wydzielony osad odsącza się, rozpuszcza w metanolu i ponownie wytrąca przez dodanie octanu etylu. Otrzymuje się 7,18 g /85,1%/ związku o wzorze C₁₃₁H₂₁₄N₃₀O₄₀ /2849,34/, skręcalności właściwej [α]_D²⁰=–26,4° /c=0,42 w dwumetyloformamidzie/ i R_f¹=0,35.

Etap 12. Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-/But/-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu-/OBu^t-Asp/OBu^t-Glu/OBu^t-Ser-Ala-OBu^t. 3 HCl

6,5 g /2,28 mmola/ Z-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg/NO₂/-Arg/NO₂/-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-/But/-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu/OBu^t-Asp/OBu^t-Glu/OBu^t-Ser-Ala-OBu^t rozpuszcza się w 85 ml kwasu octowego i roztwór poddaje uwodornieniu w obecności 2,0 g 10% palladu na węglu aktywowanym jako katalizatora. Po zakończeniu reakcji ka-

talizator odsącza się, przesącz odparowuje, a oleista pozostałość rozciera się z suchym eterem. Powstały osad odsącza się, rozpuszcza w 70 ml wody i zakwasza do pH=4 za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego i rozcieńcza 30% wodnym roztworem chlorku sodu. Wydzielony osad odsącza się, rozpuszcza w mieszaninie etanolu i chloroformu, ponownie sączy, a przesącz odparowuje się i uzyskaną pozostałość rozciera się z eterem. Otrzymuje się 5,6 g /89,5%/ związku o wzorze C₁₂₃H₂₁₃N₂₈O₃₄-Cl₃ /2734,60/, [α]_D²⁰=–26,1° /c=1 w dwumetyloformamidzie/ i R_f²=0,35.

Etap 13. BOC-D-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz-/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-/But/-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu/OBu^t-Asp/OBu^t-Glu/OBu^t-Ser-Ala-OBu^t. 3 HCl

0,525 g /0,264 mmola/ BOC-D-OSer-Tyr-Ser-Met-Glu/OBu^t-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz/BOC/-Pro-Wal-Gli.HCl i 0,720 g /0,264 mmola/ Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz/BOC/-Wal-Tyr-/But/-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu/OBu^t-Asp/OBu^t-Glu-/OBu^t-Ser-Ala-OBu^t. 3 HCl rozpuszcza się w 4 ml dwumetyloformamidu, a następnie dodaje się 0,03 ml /0,270 mmola/ N-metylmorfoliny i 0,23 g /0,40 mmola/ kompleksu DCC–PFPOH. Mieszaninę reakcyjną pozostawia się w temperaturze pokojowej w ciągu dwóch dni, następnie wydzielony osad DCU odsącza się, a przesącz rozcieńcza 40 ml eteru.

Wydzielony osad sączy się, przemywa eterem i suszy. Otrzymuje się 1,10 g /89,5%/ związku o wzorze ogólnym C₂₁₄H₃₄₄N₄₅O₅₉Cl₄S /4669,77/, o temperaturze topnienia 182–186°C i R_f¹=0,27.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych peptydów o wzorze X-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Fen-Arg-Trp-Gli-Liz-Pro-Wal-Gli-Liz-Liz-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-Wal-Tyr-Pro-Y, w którym X oznacza resztę –OGli, –OAla, D-OAla, –OSer, albo D-O-Ser, a Y oznacza ugrupowanie –Asp-Ala-Gli-Glu- albo –Asn-Gli-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala oraz ich soli addycyjnych z kwasami pochodnych i związków zespolonych, **znamienny tym**, że z peptydu, zawierającego grupy ochronne o wzorze BOC-X-Tyr-Ser-Met-Glu/O-III-rz.-But./-His-Fen-Arg-Trp-Gli/BOC/-Pro-Wal-Gli-Liz/BOC/-Liz/BOC/-Arg-Arg-Pro-Wal-Liz-/BOC/-Wal-Tyr-III-rz.-But./-Pro-Y, w którym X ma wyżej podane znaczenie, a Y oznacza ugrupowanie –Asp/O-III-rz.-But./-Ala-Gli-Glu/OIII-rz.-But./-O III-rz.-But., albo Asn-Gli-Ala-Glu /OIII-rz.-But./-Asp/OIII-rz.-But./-Glu/OIII-rz.-But./-Ser-Ala-OIII-rz.-But., odszczepia się grupy ochronne i ewentualnie wytworzony peptyd przekształca się w jego sól addycyjną z kwasem, pochodną lub związek zespolony.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wszystkie grupy chroniące odszczepia się za pomocą hydrolizy kwasowej.

3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że wszystkie grupy chroniące odszczepia się za pomocą kwasu trójfluoroctowego.