

— GLN — SER — ALA — GLU — (A) — ASP —
 — GLI — ALA — GLU — ASP — GLN — LEU
 — ALA — GLU — (B) — ASP — GLI — GLU —

ALA — GLU — ASP — SER — ALA — GLN —
 (C) — ALA — GLI — GLU — ASP — ASP —
 25 26 27 28 29
 GLU — ALA — SER — GLN — (D) — ALA —
 30 31 32 33 34
 FEN — PRO — LEU — GLU — FEN — OH
 35 36 37 38 39

w którym (A) oznacza częściową sekwencję aminokwasów 25—33 w ludzkiej kortykotropinie, (B), (C), (D) oznaczają częściowe sekwencje kortykotropiny świnińskiej, owczej i wołowej.

W podanych wzorach peptydów, jak również w następnych, użyto skrótów trzyliterowych, zgodnie z konwencją przyjętą w chemicznej syntezie peptydów i stosowaną do oznaczania aminokwasów stanowiących elementy łańcuchów peptydowych.

Wynalazek umożliwia wytwarzanie polipeptydów o ogólnym wzorze 1, w którym W ma wyżej podane znaczenie, jak również fragmentów tych polipeptydów zawierających co najmniej 15 pierwszych wymienionych aminokwasów. Sposób według wynalazku polega na tym, że nowy, nie opisany dotychczas w literaturze tetradeka-peptyd, zbudowany z pierwszych 14 aminokwasów naturalnych kortykotropin, o ogólnym wzorze 3:

OY X' X

X - SER - TYR - SER - MET - GLU - HIS -
 - FEN - ARG - TRY - GLI - LIZ - PRO - WAL -
 - GLI - R, w którym X i Y oznaczają znane grupy ochronne dające się usuwać, X' oznacza dającą się usuwać grupę ochronną, odpowiednią do ochrony grupy guanidynowej, np. trzeciorzędową grupę butylohydroksykarbonylową lub nitrową albo atom wodoru, a R oznacza grupę wodorotlenową lub znany podstawnik aktywizujący grupę karboksylową, sprzęga się metodami stosowanymi w chemii peptydów z chronionym peptydem, zawierającym sekwencję stanowiącą resztężądanego produktu polipeptydowego, po czym z otrzymanego polipeptydu usuwa się znanym sposobem grupy ochronne.

Stosowany zgodnie z wynalazkiem związek o wzorze 3, w którym wszystkie symbole mają wyżej podane znaczenie, jest związkiem trudno rozpuszczalnym i można go łatwo wytwarzać w czystej postaci. Z punktu widzenia syntezy stosowanie tego związku jest korzystne, ponieważ związek ten jako końcowy aminokwas C zawiera resztę glicyny, która nie ulega racemizacji podczas procesu sprzęgania. Związek ten można sposobem według wynalazku stosować nie tylko do wytwarzania polipeptydów o wzorze 1, ale również aktywnych biologicznie polipeptydów, które składają się z krótszych, częściowych sekwencji naturalnej kortykotropiny.

Jak wiadomo, polipeptydy zawierające częściowe sekwencje 1—13 naturalnej kortykotropiny w tej

samej postaci, a zawierające tylko część kompletnego łańcucha aminokwasów występującego w naturalnej kortykotropinie, wykazują również cenne działania terapeutyczne, prawie dorównujące hormonalnemu działaniu naturalnej kortykotropiny. W szczególności odnosi się to do peptydów składających się z pierwszych 24 lub 28 aminokwasów naturalnej kortykotropiny, mianowicie do tetra-koza — lub okta-kozapeptydów. Te krótsze fragmenty, zawierające początkowe aminokwasy 1—13 z naturalnej kortykotropiny mają również inne cenne terapeutyczne właściwości na przykład działanie mobilizujące lipidy, które występuje już we fragmentach o krótszych łańcuchach, nie wykazujących wcale, lub w bardzo małym stopniu działania adrenokortykotropowego.

Proces według wynalazku można prowadzić stosując metody sprzęgania znane w chemii peptydów, ale stwierdzono, że jeżeli reakcji z chronionym peptydem poddaje się tetradeka-peptyd o wzorze 3, w którym X, Y i X' mają wyżej podane znaczenie, a R oznacza grupę wodorotlenową, to szczególnie korzystnie jest prowadzić proces w obecności karbodwuamidu, zwłaszcza dwucykloheksylokarbodwuamidu, a jeżeli R we wzorze 3 oznacza grupę acyloksylową, wówczas korzystnie jest prowadzić reakcję w obecności zdolnego do reakcji estru lub mieszanego bezwodnika. Proces według wynalazku przebiega również bardzo korzystnie w obecności karbodwuamidu i związku hydroksylowego np. pięcioklorofenolu. Korzystnie stosuje się związki o wzorze 3, w którym X, Y i X' mają znaczenie wyżej podane, a R oznacza grupę p-nitrofenoksyłową lub pięcioklorofenoksyłową.

Produkty reakcji otrzymuje się z wydajnością wynoszącą około 60% wydajności teoretycznej, a jeżeli składniki reakcji stosuje się w ilościach równomolowych, wówczas w mieszaninie poreakcyjnej nie ma produktów wyjściowych i otrzymane polipeptydy wyodrębnia się łatwo w czystej postaci.

Przez odszczepianie znanymi sposobami grup ochronnych można otrzymane polipeptydy przeprowadzać w związki o dowolnych grupach funkcyjnych. Po oczyszczeniu można otrzymane związki stosować do celów farmakologicznych, ewentualnie w postaci kompleksów z solami metali, adduktów z żelatyną lub z ludzką białkową surowicą, albo w postaci produktów z redukującymi cukrami.

Tetradeka-peptydy i peptydy stosowane jako produkty wyjściowe w procesie prowadzonym sposobem według wynalazku można wytwarzać metodami znanymi w chemii peptydów, stosując również znane kombinacje grup ochronnych. Zgodnie z ogólnymi zasadami syntezy peptydów korzystne jest stosowanie takich grup ochronnych, które można pod koniec syntezy usunąć za pomocą łagodnej hydrolizy kwaśnej, na przykład trzeciorzędowe grupy butylohydroksykarbonylowe w celu ochrony grup aminowych i trzeciorzędowe grupy butyloestrowe w celu ochrony grup karboksylowych lub hydroksylowych. Przy wytwarzaniu produktów pośrednich można stosować grupy karbo-

nylobenzoksylowe lub p-chlorokarbonylobenzoksylowe, a dla ochrony grupy guanidynowej argininy korzystnie jest stosować grupy nitrowe. Syntezę można również prowadzić z arginina bez specjalnych grup ochronnych, zawierającą tylko protonowaną grupę guanidynową.

Jeżeli w procesie prowadzonym sposobem według wynalazku aktywującym składnikiem jest kwas acyloaminowy lub acylopeptyd, zawierający jako zakończenie C aminokwas prolinę lub glicynę, można w celu wytworzenia wiązania peptydowego stosować metody mieszanych bezwodników, aktywnych estrów lub metodę karbodiimidową. We wszystkich innych przypadkach, gdy należy się liczyć z recemizacją aktywowanych aminokwasów celowym jest stosowanie metody azydowej z wyodrębnionym lub niewyodrębnionym azydkiem w środowisku wodnym lub rozpuszczalnikach organicznych.

Przy otrzymaniu chronionego tetradekapeptydu (1—14) o ogólnym wzorze 3 celowym jest przeprowadzić znany z literatury, ester czteropeptydowy $Z - LIZ(BOC) - PRO - WAL - GLI - OC_2H_5$ najpierw w chroniony ester sześciopeptydowy $Z - TRY - GLI - LIZ(BOC) - PRO - WAL - GLI - OC_2H_5$, następnie przez sprzęgnięcie z chronioną arginina oraz usunięcie grup ochronnych przy końcowym atomie C albo N, przeprowadzić w heptapeptyd $H - ARG - TRY - GLI - LIZ(BOC) - PRO - WAL - GLI - OH$. Otrzymany peptyd najpierw acyluje się chronionym trójpetydoazidem $Z - GLU(OBu^t) - GIS - FEN - N_3$, następnie otrzymany deka-peptyd, po usunięciu ochronnej grupy końcowego N, acyluje się chronionym czteropetydoazidem $BOC - SER - TYR - SER - MET - N_3$.

W ten sposób otrzymuje się tetradekapeptyd (1—14) o wzorze:

$BOC - SER - TYR - SER - MET - GLU(OBu^t) - HIS - FEN - ARG - TRY - GLI - LIZ(BOC) - PRO - WAL - GLI - OH$ z grupami ochronionymi przy końcowym N i w łańcuchach bocznych.

Pentakozapeptyd (15—39) można korzystnie wytwarzać w ten sposób, że znany peptyd $H - GLU(OBu^t) - ALA - FEN - PRO - OH$ kondensuje się z $Z - SER - ALA - N_3$ i następnie przez hydrolizę otrzymanego produktu wytwarza się nowy heksapeptyd $H - SER - ALA - GLU(OBu^t) - ALA - FEN - PRO - OH$, który można z kolei przeprowadzić również w nowy heptapeptyd $Z - GLN - SER - ALA - GLU(OBu^t) - ALA - FEN - PRO - OH$.

Przez połączenie tego chronionego heptapeptydu ze znanym estrem trójpetydowym $H - LEU - GLU(OBu^t) - FEN - OBu^t$ otrzymuje się nowy deka-peptyd $Z - GLN - SER - ALA - GLU(OBu^t) - ALA - FEN - PRO - LEU - GLU(OBu^t) - FEN - OBu^t$. Ten deka-peptyd acyluje się najpierw odpowiednio chronionym kwasem asparaginowym, a następnie chronionym kwasem glutaminowym, w wyniku tego otrzymuje się nowe undeka- i dodekapeptydy. Ten ostatni łączy się z nowym trójpetydem $Z - ASP(OBu^t) - ALA - GLI - OH$, dzięki czemu powstaje nowy penta-

dekapeptyd, który następnie acyluje się nowym chronionym deka-peptydem, otrzymywanym przez kondensację pentapeptydu $Z - LIZ(BOC) - LIZ(BOC) - ARG(NO_2) - ARG(NO_2) - PRO - OR$ (przy czym R oznacza resztę p-nitrofenylową lub pięciochlorafenylową) z $H - WAL - LIZ(BOC) - WAL - TYR(Bu^t) - PRO - OH$.

Przez wodorolizę otrzymanego w ten sposób, chronionego pentakozapeptydu otrzymuje się nie znaną dotychczas pochodną pentakozapeptydu o wzorze 4, przy czym $X = BOC$, $Y = Bu^t$ a $X' = H$. Można również postępować w ten sposób, że wzmiankowany wyżej deka-peptyd łączy się z nowym oktapeptydem, otrzymanym w reakcji pentapeptydu $Z - WAL - LIZ(BOC) - WAL - TYR(Bu^t) - PRO - OR'$ (R' oznacza grupę aktywowującą, na przykład resztę imidu bursztynowego) z nowym trójpetydem $H - ASP(OBu^t) - ALA - GLI - OH$, w wyniku czego otrzymuje się nowy ikokapeptyd $Z - WAL - LIZ(BOC) - WAL - TYR(Bu^t) - PRO - ASP(OBu^t) - ALA - GLI - GLU(OBu^t) - ASP(OBu^t) - GLN - SER - ALA - GLU(OBu^t) - ALA - FEN - PRO - LEU - GLU(OBu^t) - FEN - OBu^t$.

Ten ikokapeptyd, po usunięciu ochronnych grup przy końcowym N i po połączeniu ze wzmiankowanym już pentapeptydem, przeprowadza się we wzmiankowany, chroniony pentakozapeptyd, z którego za pomocą wodorolizy, prowadzonej opisanym sposobem, otrzymuje się żądany składnik (15—39) o wzorze 4 ($X = BOC$, $Y = Bu^t$, $X' = H^+$).

Potrzebne do syntezy tetradeka — pentadeka — i heksapeptydu (1—14), (1—15) i (1—16) składniki aminowe są znanymi już związkami. Natomiast stosowane do wytwarzania heptadeka — albo ok-tadekapeptydu (1—17) i (1—18) składniki aminowe (15—17) albo (15—18) można otrzymać przez kondensację $Z - LIZ(BOC) - LIZ(BOC) - N_3$ z $H - ARG(NO_2) - NH_2$ albo $H - ARG(NO_2) - ARG(NO_2) - NH_2$. Przy wytwarzaniu stosowanych w syntezie nonadeka — do oktakozapeptydów [(1—19 do (1—28)] składników aminowych, można jako wspólny materiał wyjściowy stosować ester pentapeptydowy $Z - LIZ(BOC) - LIZ(BOC) - ARG(NO_2) - ARG(NO_2) - PRO - OR'$ (przy czym R' oznacza resztę potrzebną dla wytworzenia estru, na przykład resztę p-nitrofenylową lub pięciochlorofenylową).

W syntezie nonadekapeptydu (1—19) związek ten poddaje się reakcji z amoniakiem, we wszystkich innych przypadkach z odpowiednią, we właściwy sposób chronioną pochodną aminokwasową lub peptydową. Składniki aminowe stosowane do wytwarzania oktakozapeptydu (1—28) można otrzymywać z wyżej wzmiankowanego, chronionego, aktywnego estru pięciopetydowego w ten sposób, że pochodną nonapeptydową $H - WAL - LIZ(BOC) - WAL - TYR(OBu^t) - PRO - ASP(OBu^t) - GLI - ALA - GLU(OBu^t) - OBu^t$ albo $H - WAL - LIZ(BOC) - WAL - TYR(OBu^t) - PRO - ASP(OBu^t) - ALA - GLI - GLU(OBu^t) - OBu^t$ acyluje się chronionym, aktywnym estrem pięciopetydowym.

Pochodną nonapeptydową można otrzymać przez kondensację $Z - WAL - LIZ(BOC) - WAL - TYR(OBu^t) - PRO - OR'$ (przy czym R' oznacza

resztę potrzebną do wytworzenia aktywnego estru, na przykład resztę imidu hydroksybursztynowego) z H — ASP (OBut^t) — GLI — ALA — GLU(OBut^t) — OBut^t albo H — ASP(OBut^t) — ALA — GLI — GLU(OBut^t) — OBut^t.

Część z końcowym C, stosowaną do wytwarzania dotriakontapeptydu (1—32), można również otrzymać z tego chronionego, aktywnego estru pięciopeptydowego w ten sposób, że pochodną trójdekapeptydową (20—32) acyluje się wyżej wzmiankowaną pochodną pięciopeptydową. Pochodną trójdekapeptydową (20—23) otrzymuje się z chronionego, aktywnego estru oktapeptydowego (20—27) i pochodnej pięciopeptydowej (28—32).

W celu oczyszczenia wielkocząsteczkowych, niekryształizujących wielopeptydów poleca się w literaturze bardzo skomplikowane metody oparte na jonowymiennej chromatografii, elektroforezie lub przeciwwprądowym rozdzielaniu. W nowej syntezie, będącej przedmiotem wynalazku, możliwe jest pominięcie tych skomplikowanych metod oszyszczenia produktów pośrednich, mianowicie można różne produkty pośrednie, a nawet chronione produkty końcowe, wyodrębniać w czystej postaci za pomocą jednej tylko, mającej ogólne zastosowanie, operacji oczyszczania — prostego chromatograficznego rozdzielania w kolumnie z żelam krzemionkowym. Skalę tej operacji chromatograficznej można dowolnie zwiększać co pozwala na stosowanie tej metody z powodzeniem także przy otrzymywaniu większych ilości wielopeptydów.

Przy rozdzielaniu chromatograficznym na żelu krzemionkowym chronionych wielopeptydów uzyskuje się produkty o dostatecznym stopniu czystości, wobec czego otrzymane po usunięciu grup ochronnych wolne peptydy, można otrzymywać w chromatograficznie czystej postaci, bez dalszego oczyszczania.

Sposób wytwarzania będący przedmiotem wynalazku uwidocznił w podanych niżej przykładach. Poszczególne produkty pośrednie i końcowe podano w tych przykładach stosując skróty przyjęte w chemii peptydów. Oprócz już wyżej wzmiankowanych zwykłych skrótów dla poszczególnych reszt aminokwasów, wprowadzono odpowiednie skróty dla następujących grup ochronnych:

Z = karbobenzylksoylowa $C_6H_5CH_2OCO-$

BOC = trzeciorzędowa butyloksykarbonylowa

$CH_3/_3COCO-$

But^t = trzeciorzędowa butylowa $C(CH_3)_3$

NB = p-nitrobenzylowa

NP = p-nitrofenylowa

PCP = pięcioklorofenylowa

W przykładach umieszczono dane dotyczące identyfikacji, mianowicie chromatograficzne wartości R_f w odniesieniu do różnych układów rozpuszczalników; cyfry umieszczone przy symbolu „R_f” odnoszą się do następujących układów rozpuszczalników:

1. Octan etylu — pirydyna — kwas octowy — woda 60 : 20 : 6 : 11;
2. Octan etylu — pirydyna — kwas octowy — woda 60 : 10 : 3 : 5,5;
3. Chloroform — metanol — woda 60 : 38 : 10;
4. Chloroform — metanol 90 : 10;

5. Octan etylu — pirydyna — kwas mrówkowy — woda 40 : 20 : 6 : 5,5;
6. Butanol — pirydyna — kwas octowy — woda 30 : 20 : 6 : 24;
7. Octan etylu — pirydyna — kwas mrówkowy — woda 60 : 20 : 6 : 5,5;
8. Chloroform — metanol — woda 40 : 10 : 1;
9. Chloroform — metanol — woda 60 : 26 : 5;
10. Chloroform — metanol 80 : 15;
11. Chloroform — metanol 80 : 20;
12. Octan etylu — pirydyna — kwas octowy — woda 240 : 20 : 6 : 11.

Przykład I. Sposób wytwarzania ludzkiej kortykotropiny

Etap 1: Z — SER — ALA — GLU(OBut^t) — ALA — FEN — PRO (31—36).

3,6 g (11,1 milimola) chronionego hydrozydu dwupeptydu Z — SER — ALA — N₂H₃ (patrz J. I. Harris, J. S. Fruton: J. Biol. Chem. 191, 143 (1951) przeprowadzono w stan zawiesiny w 36 ml dwumetyloformamidu, do zawiesiny dodano 5,55 ml 6 normalnego kwasu solnego w temperaturze — 30°C, następnie temperaturę powoli podniesiono. Substancja w zawiesinie rozpuściła się w temperaturze około — 20°C. Następnie roztwór oziębiono poniżej temperatury — 30°C i dodano kroplami 2,2 ml 5-molowego roztworu azotynu sodu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w ciągu 15 minut przy temperaturze — 20°C aż do temperatury — 30°C, następnie dodano wodny roztwór składnika aminowego; roztwór ten otrzymano przez rozpuszczenie 4,92 g wolnego cztero-peptydu GLU(OBut^t) — ALA — FEN — PRO w 20 ml wody, zawierającej 1,33 ml (9,5 milimola) trójetiloaminy patrz S. Bajusz, T. Lázár: Acta Chim. Hung. 38. 111 (1966). Po wymieszaniu obu roztworów podwyższono powoli temperaturę do 0°C, i pozostawiono mieszaninę na noc. Następnie roztwór zakwaszono kwasem cytrynowym do pH ~3, po czym oddzielono powstały heksapeptyd: otrzymano 5,65 g (73,5% wydajności teoretycznej) heksapeptydu; temperatura topnienia 172—173°C.

R_f² 0,23—0,33, R_f¹ 0,65—0,75
C₄₀H₅₄O₁₂N₆ (810,88).

Etap 2: SER — ALA — GLU(OBut^t) — ALA — FEN — PRO (31—36).

5,8 g (7,15 milimola) chronionego heksapeptydu, otrzymanego w etapie 1, rozpuszczono w 100 ml 80% kwasu octowego i uwodorniano wobec palladu na węglu aktywnym. Postęp reakcji śledzono za pomocą chromatografii. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, roztwór odparowano, do pozostałości dodano metanol i ponownie odparowano. Z metanolowego roztworu pozostałości wydzielił się produkt w postaci krystalicznej. Otrzymaną, gęstą zawiesinę kryształów rozcieńczono eterem etylowym, kryształy odsączono, przemyto eterem i wysuszono. Otrzymano 4,3 g (89% teoretycznej) wolnego heksapeptydu: temperatura topnienia 200—202°C.

R_f¹ 0,15—0,20.

Etap 3: Z — GLN — SER — ALA — GLU(OBut^t) — ALA — FEN — PRO (30—36).

4,3 g (6,35 milimola) wolnego heksapeptydu otrzymanego w etapie 2, 0,45 ml (6,35 milimola) trójetiloaminy i 2,81 g (7,0 milimola) estru karbo-benzoksy glutamino — p-nitrofenyloвого rozpuszczono w 13,0 ml pirydyny w temperaturze 50°C. Mieszaninę pozostawiono na jeden dzień, następnie otrzymany galaretowaty produkt reakcji rozcieńczono eterem etylowym, następnie kwasem cytrynowym i przekrystalizowano z metanolu. Otrzymano 4,65 g (78% wydajności teoretycznej) chronionego heptapeptydu; temperatura topnienia 188—190°C.

Rf¹ 0,45—0,52.

C₄₅H₆₂O₁₄N₈ (939,01).

Etap 4: Z — GLN — SER — ALA — GLU(OBu^t) — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU(OBu^t) — FEN — OBu^t (30—39).

3,95 g (0,06 milimola) chronionego estru trójetiloaminy Z — LEU — GLU(OBu^t) — FEN — OBu^t (patrz S. Bajusz, T. Lázár: Acta Chim. Hung. 48, 111 (1966), rozpuszczono w 50 ml metanolu i uwodorniano wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono a przesącz odparowano. Otrzymany jako pozostałość olej rozpuszczono w 4 ml dwumetyloformamidu po czym roztwór dodano do roztworu składnika bezwodnikowego, otrzymanego niżej opisanym sposobem.

4,55 g (4,84 milimola) chronionego peptydu, otrzymanego w etapie 3, rozpuszczono w 25 ml dwumetyloformamidu, następnie dodano 0,675 ml (4,82 milimola) trójetiloaminy i oziębiono do -30°C. Do oziębionego roztworu dodano kroplami 0,49 ml (około 4,9 milimola) chlorowęgla etylu, mieszaninę mieszano w temperaturze -20°C w ciągu 10 minut i następnie połączono z roztworem składnika aminowego, otrzymanego w sposób podany wyżej. Mieszaninę pozostawiono na noc, następnie dodano 0,5 ml trójetiloaminy, rozcieńczono około 100 ml wody. Wydzielony osad odsączono, przemyto wodą aż do otrzymania odczynu obojętnego, wysuszono, następnie przemyto eterem etylowym, w końcu rozpuszczono na gorąco w 100 ml metanolu i 70 ml wody i pozostawiono do krystalizacji. Otrzymany produkt odsączono, przemyto 60% metanolem i wysuszono. Otrzymano 5,9 g (84% wydajności teoretycznej) chronionego decapeptydu; temperatura topnienia 213—214°C. Rf⁴ 0,23—0,30, Rf¹² 0,28—0,35 C₇₃H₁₀₅O₁₉N₁₁ (1440,66).

Etap 5: Z — ASP (OBu^t) — GLN — SER — ALA — GLU(OBu^t) — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU(OBu^t) — FEN — OBu^t (29—39).

6,48 g (4,5 milimola) chronionego decapeptydu, otrzymanego w etapie 4, rozpuszczono w 200 ml dwumetyloformamidu, dodano 4,5 ml normalnego kwasu solnego i uwodorniano wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, roztwór odparowano, rozcieńczono mieszaniną eteru etylowego i eteru naftowego, przemyto tą samą mieszaniną, następnie przemyto eterem etylowym i wysuszono. Otrzymano 5,62 g (87% o wydajności teoretycznej) wolnego chlorowo-

dorku decapeptydu; Rf⁵ 0,12—0,23. Otrzymany w powyższy sposób wolny chlorowodorek decapeptydu (0,03 milimola) rozpuszczono w 12,5 ml dwumetyloformamidu, dodano 0,565 ml (4,03 milimola) trójetiloaminy, następnie 2,7 g (6,05 milimola) estru p-nitrofenyloвого kwasu α-karbonylobenzoksy — β-III-rzęd.-butylo-asparaginowego i pozostawiono na 40 godzin w temperaturze 50°C. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono eterem etylowym i odsączono. Surowy produkt otrzymany w postaci osadu, przemyto eterem etylowym, rozpuszczono w 130 ml etanolu, następnie do roztworu dodano węgiel aktywny, po czym węgiel aktywny odsączono, przemyto 26 ml gorącego metanolu i oczyszczony przesącz metanolowy rozcieńczono 105 ml gorącej wody. Wydzielony produkt po odsączeniu i przemyciu ponownie wytrącono w 130 ml metanolu i 100 ml wody. Otrzymano 4,9 g (75,5% wydajności teoretycznej) chronionego undekapeptydu; temperatura topnienia 211—213°C.

Rf¹² 0,4—0,45, Rf⁴ 0,27—0,33

C₈₁H₁₁₈O₂₂N₁₂ (1611,85).

Etap 6: Z — GLU(OBu^t) — ASP(OBu^t) — GLN — SER — ALA — GLU(OBu^t) — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU(OBu^t) — FEN — OBu^t (28—39).

4,6 g (2,85 milimola) chronionego undekapeptydu, otrzymanego w etapie 5, uwodorniano wobec palladu na węglu aktywnym w 250 ml 80% kwasu octowego. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, roztwór odparowano, pozostałość rozcieńczono eterem etylowym, odsączono i wysuszono. Otrzymano 4,25 g (97% wydajności teoretycznej) undekapeptydu wolnego przy końcowym N. Produkt wymieszano z 10 ml dwumetyloformamidu oraz z 2,1 g (4,5 milimola) estru p-nitrofenyloвого kwasu α-karbonylobenzoksy — β-III-rzęd.-butylo-glutaminowego i pozostawiono w ciągu 20 godzin w temperaturze 50°C. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono eterem etylowym i wysuszono. Surowy produkt, otrzymany w ten sposób, gotowano z 20 ml mieszaniny octanu etylu pirydyny, kwasu octowego i wody (60:10:3:5), po czym ochłodzono lodem a wytrącony galaretowaty produkt odsączono, przemyto dwukrotnie 2 ml wyżej podanej mieszaniny rozpuszczalników, następnie eterem etylowym i wysuszono. Otrzymano 3,48 g (70% wydajności teoretycznej) chronionego dodekapeptydu; temperatura topnienia 201—203°C.

Rf¹² 0,46—0,53 Rf⁴ 0,47—0,52

C₉₀H₁₃₃O₂₅N₁₃ (1797,07).

Etap 7: GLU(OBu^t) — ASP(OBu^t) — GLN — SER — ALA — GLU(OBu^t) — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU(OBu^t) — FEN — OBu^t. HCl (28—39).

Do 2,34 g (1,3 m mola) chronionego dodekapeptydu, otrzymanego w etapie 6, rozpuszczonego w 20 ml dwumetyloformamidu, dodano 1/3 ml normalnego kwasu solnego i uwodorniano wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, roztwór odparowano, pozostałość rozcieńczono około 10 ml 15% roztworu wodnego soli kuchennej, odsączono, przemyto małą ilością zimnej wody i wysuszono. Otrzymano 2,11 g (95,5% wydajności teoretycznej) wolnego

chlorowodoru dodekapeptydu; R_f^{10} 0,48—0,53, R_f^4 0,06—0,15. $C_{82}H_{128}O_{23}N_{13}Cl$ (1699,40).

Etap 8: Z — ALA — GLI — ONB (26—27) NB = p-nitrobenzyl).

Z 2,80 g (9,65 milimola) H — GLI — ONB — HBr (patrz H. Schwarz, K. Arakawa: J. Am. Chem. Soc. 81, 5691 (1959). Sporządzono zawiesinę w mieszaninie 5 ml wody i 15 ml octanu etylu, którą wytrząsano w temperaturze 0°C z 15 ml zimnego, nasyconego roztworu węglanu potasu. Po rozdzielaniu faz warstwą wodną wytrząsano jeszcze dwukrotnie z octanem etylu. Roztwory octanu etylu oczyszczono, osuszono i odparowano w temperaturze pokojowej pod próżnią. Otrzymano 2,0 g (100% wydajności teoretycznej) krystalicznego, wolnego estru p-nitrobenzylowego glicyny, który można stosować do dalszej syntezy bez przekrystalizowania.

2,0 g (9,5 milimola) estru p-nitrobenzylowego glicyny i 2,13 g (9,5 milimola) karbonyloksy alzyny rozpuszczono w 20 ml chlorku metylenu. Roztwór oziębiono do temperatury 0°C, po czym dodano roztwór 1,98 g (9,5 milimola) dwucykloheksylokarboduimidu w 4 ml chlorku metylenu.

Mieszaninę mieszano w temperaturze 0°C w ciągu jednej godziny oraz w ciągu drugiej godziny w temperaturze pokojowej, następnie pozostawiono na noc. Powstały dwucykloheksylomocznik (2,0 g 93% wydajności teoretycznej) usunięto przez odsączenie, a przesącz przemyto rozcieńczonym kwasem solnym, wodą, następnie 5% roztworem wodorowęglanu sodu oraz ponownie wodą, po czym wysuszono i odparowano. Pozostałość przekrystalizowano z mieszaniny 20 ml octanu etylu i 20 ml eteru naftowego. Otrzymany, chroniony ester dwupeptydowy (3,50 g) ponownie przekrystalizowano z mieszaniny metanolu i wody. Otrzymano 2,0 g (76% wydajności teoretycznej) chronionego estru dwupeptydowego; temperatura topnienia 104—106°C, R_f^7 0,5—0,6.

Analiza: $C_{20}H_{21}O_7N_3$ (415,396)

Obliczono: C 57,80%, H 5,10%, N 10,10%

Otrzymano: C 57%, H 5,4%, N 10,1%.

Etap 9: ALA — GLI — ONB — HBr (26—27).

4,0 g (9,6 milimola) chronionego estru dwupeptydowego, otrzymanego w etapie 8, rozpuszczono w 5 ml octanu etylu, po czym dodano 15 ml około 4 n kwasu bromowodorowego. Mieszaninę pozostawiono w temperaturze pokojowej (około jednej godziny) aż do zakończenia burzliwej reakcji. Produkt wytrącono przez dodanie absolutnego eteru etylowego, zamieszano, przesączono, przemyto eterem i wysuszono. Otrzymany surowy produkt 3,30 g przekrystalizowano z 20 ml etanolu. Otrzymano 3,0 (86% wydajności teoretycznej) wolnego estru dwupeptydowego.

R_f^1 0,6—0,7

Analiza: $C_{12}H_{15}O_5N_3 \cdot HBr$ (363,188)

Obliczono: C_{39} , 80%, H 4,45%, N 11,61%, Br 22,05%

Otrzymano: C 40,1%, H 4,8%, N 11,6%, Br 22,25%.

Etap 10: Z — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — ONB (25—27).

2,40 g (7,5 milimola) kwasu karbonylobenzoksy — β -III-rzęd.-butylo-asparagowego i 2,70 g (7,5 milimola) otrzymanego bromowodoru estru dwupeptydowego rozpuszczono w 8 ml dwumetyloformidu, roztwór oziębiono do temperatury 0°C, po czym dodano 1,54 g (7,5 milimola) dwucykloheksylokarboduimidu, a po jego rozpuszczeniu dodano 1,04 ml (7,5 milimola) trójetyloaminy. Mieszaninę mieszano w ciągu godziny w temperaturze 0°C i w ciągu drugiej godziny w temperaturze pokojowej. Następnego dnia mieszaninę reakcyjną odparowano, pozostałość rozpuszczono w octanie etylu, roztwór wytrząsano z 1 normalnym roztworem kwasu cytrynowego, następnie z wodą, z 0,2 normalnym roztworem wodorowęglanu potasu i w końcu ponownie z wodą. Roztwór organiczny wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu i odparowano. Pozostałość przekrystalizowano z mieszaniny octanu etylu i eteru naftowego. Otrzymano 2,8 g (64% wydajności teoretycznej) chronionego estru dwupeptydowego. Temperatura topnienia 122—124°C. R_f^7 0,2—0,3.
 $C_{28}H_{34}O_{10}N_4$ (586,588).

Etap 11: ASP(OBu^t) — ALA — GLU (25—27).

1,0 g (1,7 milimola) chronionego estru dwupeptydowego, otrzymanego w etapie 10, uwodorniono w 15 ml metanu wobec palladu na węglu aktywnym. Wolny trójpeptyd wydziela się aż do momentu zakończenia reakcji. Produkt ten rozpuszczono ponownie w wodzie, następnie usunięto katalizator przez odsączenie, przemyto i przesącz odparowano. Krystaliczną pozostałość przekrystalizowano z mieszaniny wody i acetonu. Otrzymano 0,40 g (74% wydajności teoretycznej) wolnego trójpeptydu. Temperatura rozkładu 194°C.

R_f^1 0,10—0,15.

Analiza: $C_{13}H_{23}O_6N_3$ (317,38)

Obliczono: C 49, 20%, H 7,30%, N 13,24%

Otrzymano: C 49,4%, H 7,5%, N 13,3%

Etap 12: Z — ASP(OBu^t) — ALA — GLU — (25—27)

0,9 g (2,85 milimola) wolnego trójpeptydu, otrzymanego w etapie 11, rozpuszczono w 25 ml 5% roztworu wodorowęglanu sodu w temperaturze 0°C i w stanie ochłodzonym mieszając dodano, kroplami 0,64 ml (3 milimole) około 80% karbonylobenzonooksylochlorku. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej do momentu kiedy nie wykrywano już za pomocą analizy chromatograficznej wolnego trójpeptydu (około 48 godzin). Następnie roztwór wytrząsano z eterem etylowym i zakwaszono kwasem cytrynowym do pH = 3. Wydzielony olej ekstrahowano octanem etylu, oczyszczony ekstrakt octano-etylowy przemyto wodą, wysuszono i odparowano. Pozostałość rozcieńczono eterem naftowym. Otrzymano 1,15 g (90% wydajności teoretycznej) bezpostaciowego, chronionego trójpeptydu. R_f^1 0,7—0,8

$C_{21}H_{25}O_8N_3$ (451,46)

Etap 13: Z — ASP(OBu^t) — ALA — GLU — (OBu^t) — ASP(OBu^t) — GLN — SER — ALA — GLU(OBu^t) — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU(OBu^t) — FEN — OBu^t (25—39).

342 mg (0,76 milimola) chronionego trójeptydu, otrzymanego w etapie 12, rozpuszczono w 5 ml dwumetyloformamidu, następnie dodano najpierw 0,106 (0,76 milimola) trójetiloaminy, potem w temperaturze -10°C 0,76 ml (około 0,76 milimola) chlorowęgla etylu. Mieszaninę mieszano w ciągu 15 minut, następnie dodano roztwór 937 mg (0,75 milimola) chlorowodoru dodekapeptydu otrzymanego w etapie 7, po czym dodano kroplami 0,077 ml (0,55 milimola) trójetiloaminy w 2,8 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej, następnie rozcieńczono wodą, wytrącony osad oddzielono, przemyto wodą, wysuszono i następnie przemyto eterem etylowym. Otrzymany surowy produkt ponownie wytrącono z mieszaniny 45 ml metanolu i 10 ml wody, odsączono i wysuszono. Otrzymano 805 mg (70% wydajności teoretycznej) chronionego pentadekapeptydu: Rf^4 0,18—0,23; Rf^5 0,65—0,70. $C_{105}H_{154}O_{30}N_{16}$ (2096,39).

Etap 14: H — ARG(NO_2) — ARG(NO_2) — PRO — OH. HBr (17—19).

6,5 g chronionego trójeptydu Z — Arg(NO_2) — ARG(NO_2) — PRO — OH — (patrz K. Sturm, R. Geiger, W. Siedel, Ber. 96, 609 (1963) rozpuszczono w 25 ml lodowatego kwasu octowego, dodano 25 ml 4 normalnego roztworu kwasu bromowodorowego w lodowatym kwasie octowym i pozostawiono. Po zakończeniu burzliwej reakcji wytrącono bromowodork trójeptydu przez dodanie 200 ml eteru etylowego. Następnie eter zdekantowano, osad w ten sam sposób przemyto eterem etylowym, potem izopropanolem, odsączono, jeszcze raz przemyto na filtrze izopropanolem i wysuszono. Otrzymano 5,4 g (90% wydajności teoretycznej) bromowodoru trójeptydu; Rf^1 0,0 Rf H_2O 0,5—0,6.

Etap 15: Z — LIZ(OBC) — LIZ(BOC) — N_2H_3 (15—16).

8,6 estru dwupeptydowego Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — OMe (patrz: R. Schwyzer i W. Rittel: Helv. Chim. Acta 44, 159 (1961) rozpuszczono w 15 ml gorącego metanolu, dodano 6 ml 73% wodzianu hydrazyny i gotowano w ciągu 4 godzin pod chłodnicą zwrotną. Po zakończeniu reakcji roztwór zatężono, krystaliczną pozostałość wymieszano z wodą i wysuszono. Otrzymano 7,8 g (90% wydajności teoretycznej) krystalicznego, chronionego hydrazynu dwupeptydu. Temperatura topnienia $126-128^{\circ}\text{C}$. Rf^4 0,50—0,60 (dla estru 1,0). Analiza: $C_{30}H_{50}O_8N_6$ (622,75) Obliczono: N 13,5% Otrzymano: N 13,5%

Etap 16: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO_2) — ARG(NO_2) — PRO — OH (15—19).

7,8 g hydrazynu dwupeptydu Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — N_2H_3 , otrzymanego w etapie 15, rozpuszczono w 125 ml dwumetyloformamidu, po czym w temperaturze około -10°C dodano 50 ml 0,5 normalnego roztworu kwasu solnego, a następnie 12,5 ml 1 normalnego roztworu azotynu sodu. Mieszaninę mieszano w ciągu 15 minut w tempera-

turze około -10°C , następnie zobojętniono 1,0 ml trójetiloaminy i rozcieńczono dodając 250 ml oziębionego chloroformu i 250 ml wody. Po oddzieleniu warstwy chloroformowej, warstwę wodną ponownie przemyto chloroformem. Połączone roztwory chloroformowe przemyto zimną wodą i wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Otrzymany roztwór azydu w chloroformie dodano do roztworu powstałego przez rozpuszczanie 7,5 g wodorobromku trójeptydu, otrzymanego w etapie 14, w 17 ml dwumetyloformamidu z dodatkiem 4,62 ml trójetiloaminy. Chloroform oddestylowano z mieszaniny pod próżnią, a pozostałą mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 2 dni w temperaturze pokojowej. Następnie dwumetyloformamid oddestylowano a pozostałość rozdzielono metodą chromatograficzną za pomocą mieszaniny octanu etylu, pirydyny, kwasu octowego i wody (60:10:3:5,5) w kolumnie zawierającej 250 g żelu krzemionkowego. Frakcje zawierające czysty, chroniony pięciopeptyd zebrano, odparowano i rozcieńczono w temperaturze 0°C 1 normalnym kwasem solnym i wodą. Ciecze stosowane do przemywania usuwano przez dekantowanie. Otrzymany jako pozostałość gęsty olej, rozpuszczono w chloroformie, roztwór wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i odparowano. Po rozcieńczeniu pozostałości z odparowania eterem etylowym otrzymano 5,1 g (42% wydajności teoretycznej) chronionego pięciopeptydu.

Rf^1 0,45—0,55; $D^{20} = -19^{\circ}$ ($C = 1$, w metanolu).

Analiza: $C_{47}H_{77}O_{61}N_{15}$ (1108,21)

Obliczono: C 51,6%, H 6,95%, N 18,9%

Otrzymano: C 51,5%, H 7,0%, N 19,0%

Etap 17: a) Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO_2) — ARG(NO_2) — PRO — ONP 15—19), (NP = p-nitrofenyl).

0,65 g chronionego pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 16, rozpuszczono w 3,0 ml dwumetyloformamidu, do roztworu dodano najpierw 0,082 ml trójetiloaminy, następnie w temperaturze -10°C dodano 0,059 ml chlorowęgla etylu. Mieszaninę chłodzono w ciągu 10 minut, następnie dodano 0,24 g p-nitrofenolu i pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Następnie dwumetyloformamid oddestylowano a pozostałość rozdzielono metodą chromatograficzną za pomocą mieszaniny chloroformu i metanolu (9:1) w kolumnie zawierającej 14 g żelu krzemiankowego. Frakcje zawierające produkt główny zebrano razem, odparowano a pozostałość rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 0,47 g (65% wydajności teoretycznej) chronionego estru p-nitrofenylowego pięciopeptydu. Rf^4 0,3—0,4:

$[\alpha]^{20} = -20^{\circ}$ ($C = 1$, w metanolu)

Analiza: $C_{53}H_{80}O_{18}N_{16}$ (1229,30)

Obliczono: N 18,2%

Otrzymano: N 18,1%

b) Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO_2) — ARG(NO_2) — PRO — OPCP (15—19) (PCP = pięciochlorofenyl-).

1,62 g chronionego pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 16, 0,45 g pięciochlorofenolu i 0,4 g dwucykloheksylokarbodwuimidu rozpuszczono w 4,0 ml

dwumetyloformamidu. Mieszaninę pozostawiono na noc, następnie wytrącony dwucykloheksylomocznik usunięto przez odsączenie. Z przesączu odparowano dwumetyloformamid, pozostałość rozcieńczono eterem etylowym i rozpuszczono w 1 ml mieszaniny chloroformu, acetonu i wody (40 : 40 : 1), następnie rozdzielono metodą chromatograficzną za pomocą mieszaniny chloroformu, acetonu i wody w kolumnie zawierającej 50 g żelu krzemionkowego. Frakcje zawierające aktywny ester w czystej postaci zebrano razem, odparowano a pozostałość rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 1,4 g (70% wydajności teoretycznej) chronionego estru pięciopeptydowego. R_f 0,55—0,65. R_f w układzie chloroform—aceton—woda (40 : 40 : 10) 0,45—0,55.

Analiza: $C_{53}H_{76}O_{16}N_{15}Cl_5$ (1356,54)

Obliczono: N 15,4%, Cl 13,05%;

Otrzymano: N 15,35%, Cl 13,1%

Etap 18: Z — TYR(Bu^t) — OSu (23) (Su oznacza resztę bursztynylową).

Z 175 g drobno sproszkowanej soli dwucykloheksyloamonowej Z — TYR(Bu^t) — OH sporządzono zawiesinę w 1 litrze eteru etylowego i po dodaniu roztworu 17,5 ml stężonego kwasu solnego w 1250 ml wody, wytrząsano do całkowitego rozpuszczenia. Roztwór eterowy następnie wysuszono i odparowano. Otrzymany jako pozostałość olej rozpuszczono w 625 ml bezwodnego dioksanu, do roztworu dodano 33,25 g imidu N-hydroksybursztynowego i 65,7 g dwucykloheksylokarboimidu przy jednoczesnym oziębieniu lodem. Mieszaninę pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Wytrącony dwucykloheksylomocznik usunięto przez odsączenie, dioksan oddestylowano pod próżnią a otrzymany jako pozostałość olej rozcieńczono eterem naftowym. Po przekrystalizowaniu surowego produktu z 180 ml metanolu otrzymano 80 g (54% wydajności teoretycznej) aktywnego estru. Temperatura topnienia 118—120°C.

Etap 19: H — TYR(Bu^t) — PRO — OH (23—24).

160 g aktywnego estru Z — TYR(Bu^t) — OSu. Rozpuszczono w 2 litrach bezwodnego dioksanu, roztwór ten połączono z roztworem 50,3 g proliny i 36,7 g wodorowęglanu sodu w 1,5 litra wody i mieszano w ciągu 2 godzin, w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę zateżono pod próżnią do objętości około 1 litra, pozostałość rozcieńczono 600 ml wody i wytrząsano z 1 litrem octanu etylu. Oddzielony roztwór w octanie etylu przemyto najpierw 8% roztworem wodorowęglanu sodu potem wodą. Połączone roztwory wodne zakwaszono kwasem cytrynowym do pH = 3, a wydzielony olej ekstrahowano octanem etylu. Roztwór w octanie etylu wysuszono i odparowano pod próżnią. Otrzymany jako pozostałość surowy karbonylobenzylodwupeptyd rozpuszczono w 2,5 litrze etanolu i poddano wodorolizie wobec palladu na węglu aktywnym. Po odsączeniu katalizatora roztwór odparowano pod próżnią. Otrzymano jako pozostałość 90—95 g (79,83% wydajności teoretycznej) bezpostaciowego dwupeptydu, który następnie przekrystalizowano z wody.

Etap 20: H — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — OH (22—24)

21,5 g dwupeptydu H — TYR(Bu^t) — PRO — OH, otrzymanego w etapie 19 i 9,05 ml trójetyloaminy rozpuszczono w 250 ml bezwodnego dioksanu, następnie do roztworu dodano, 17,9 g aktywnego estru waliny Z — WAL — OSu. Mieszaninę pozostawiono do następnego dnia w temperaturze pokojowej, następnie odparowano pod próżnią a pozostałość rozpuszczono w mieszaninie 300 ml 8% wodnego roztworu wodorowęglanu sodu i 150 ml eteru etylowego. Warstwę wodną oddzielono, zakwaszono kwasem cytrynowym pH = 3 a wydzielony olej ekstrahowano chloroformem. Ekstrakt chloroformowy wysuszono i odparowano. Otrzymany jako pozostałość surowy karbonylobenzylodwupeptyd rozpuszczono w 250 ml 80% kwasu octowego i poddano wodorolizie wobec palladu na węglu aktywnym. Po odsączeniu katalizatora i oddestylowaniu rozpuszczalnika, surowy trójpeptyd, otrzymany jako pozostałość, przekrystalizowano z 1,1 litra bezwodnego metanolu. Otrzymano ogółem 13,7 g (62% wydajności teoretycznej) wolnego trójpeptydu; temperatura topnienia 134—136°C.

Etap 21: Z — LIZ(BOC) — OSu (21)

67,3 g Z — LIZ(BOC) — OH rozpuszczono w 300 ml bezwodnego dioksanu po czym, do roztworu oziębionego lodem, dodano 20,4 imidu N-hydroksybursztynowego oraz 37,0 g dwucykloheksylokarbodwuimidu. Mieszaninę oziębiono w ciągu godziny, następnie pozostawiono w ciągu 3 godzin w temperaturze pokojowej. Wytrącony dwucykloheksylo-mocznik odsączono i przesącz odparowano. Otrzymany jako pozostałość surowy produkt przekrystalizowano z mieszaniny 350 ml bezwodnego benzenu i 250 ml eteru naftowego. Otrzymano 59 g (70% wydajności teoretycznej) aktywnego estru. Temperatura topnienia 93—96°C.

Etap 22: H — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — OH (21—24).

53,6 trójpeptydu WAL — TYR — (Bu^t) — PRO — OH, otrzymanego w etapie 20, oraz 17,2 g trójetyloaminy rozpuszczono w 600 ml dioksanu, następnie do roztworu dodano 59,1 g aktywnego estru lizyny Z — LIZ(BOC) — OSu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej, następnie odparowano pod próżnią, pozostałość rozpuszczono w 800 ml octanu etylu. Roztwór wytrząsano z wodą, następnie z 16% roztworem kwasu cytrynowego i w końcu ponownie z wodą. Roztwór w octanie etylu po wysuszeniu odparowano pod próżnią, pozostałość rozpuszczono w 1 litrze 80% kwasu octowego i poddano wodorolizie wobec palladu na węglu aktywnym. Po odsączeniu katalizatora i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymany surowy produkt przekrystalizowano z 4,2 litra bezwodnego metanolu. Otrzymano ogółem 59,5 g (73% wydajności teoretycznej) trójpeptydu. Temperatura topnienia 192—193°C.

Etap 23: Z — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — OH (20—24).

W 410 ml bezwodnego dwumetyloformamidu roz-

puszczono przy jednoczesnym wytrząsaniu 41,0 g eteropeptydu H — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — OH, otrzymanego w etapie 22, oraz 8,6 ml trójetyloaminy, następnie dodano 21,5 g aktywnego estru wyliny Z — WAL — OSu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono do następnego dnia w temperaturze pokojowej, po czym odparowano pod próżnią, pozostałość rozpuszczono w 800 ml chloroformu. Następnie roztwór wytrząsano z 10% roztworem kwasu cytrynowego a potem z wodą, po wysuszeniu chloroform oddestylowano. Po rozcieńczeniu pozostałości eterem naftowym otrzymano 51,0 g (93% wydajności teoretycznej) chronionego pięciopeptydu. Temperatura topnienia 123—126°C.

Etap 24: H — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — OH (20—24).

1,4 g (1,565 milimola) chronionego pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 23, rozpuszczono w 30 ml 80% kwasu solnego i poddano wodorolizie wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono i przesącz odparowano. Do pozostałości po odparowaniu dodano 10 ml metanolu i pozostawiono do wykrystalizowania. Otrzymane kryształy odsączono i przemyto zimnym metanolem. Otrzymano 0,785 g (66% wydajności teoretycznej) wolnego pięciopeptydu. Temperatura topnienia 202—205°C.
C₃₉H₆₄O₉N₆ (760,95).

Etap 25: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO₂) — ARG(NO₂) — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO (15—24).

481 mg (0,63 milimola) pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 24, 841 mg (0,62 milimola) chronionego aktywnego estru pięciopeptydu Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO₂) — ARG(NO₂) — PRO — ONP, otrzymanego w etapie 17, oraz 0,088 ml (0,63 milimola) trójetyloaminy rozpuszczono w 3 ml dwumetyloformamidu w 50°C. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na przeciąg 8 godzin, następnie produkt wytrącono eterem etylowym, rozcieńczono roztworem kwasu cytrynowego i wysuszono. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatograficzną za pomocą mieszaniny octanu etylu — pirydyny — kwasu octowego — wody 60:10:3:5,5 w kolumnie z żelalem krzemionkowym. Otrzymano 848 mg (74% wydajności teoretycznej) chronionego deka-peptydu. Temperatura topnienia 167—170°C.

Rf² 0,30—0,36; Rf¹⁰ 0,10—0,18

C₈₈H₁₃₆O₂₄N₂₁ (1851,14)

Etap 26: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO₂) — ARG(NO₂) — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — OPCP (15—24)

841 mg (0,453 milimola) chronionego deka-peptydu, otrzymanego w etapie 25, i 145 mg (0,545 milimola) pięcioklorofenolu rozpuszczono w 2,0 ml dwumetyloformamidu, do oziębionego lodem roztworu dodano 144 mg (0,695 milimola) dwucykloheksylokarbodwuimidu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 2 dni, następnie wytrącony mocznik odsączono, przemyto dwumetyloformamidem, po-

łączone roztwory w dwumetyloformamidzie odparowano i następnie stężony roztwór acetonowy pozostałości przeniesiono do kolumny z żelalem krzemionkowym. Kolumnę eluowano acetonem, przy czym nie przereagowany kwas pozostał związany w kolumnie. Otrzymany acetonowy roztwór estru odparowano, pozostałość rozcieńczono eterem etylowym, przemyto i wysuszono. Otrzymano 704 mg (74% wydajności teoretycznej) chronionego aktywnego estru dodeka-peptydu.

Rf² 0,80—0,87; Rf¹² 0,24—0,33; Rf¹⁰ 0,79—0,86

C₉₂H₁₃₈O₂₄N₂₁Cl₅ (2099,48).

Etap 27: LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — GLU(OBu^t) — ASP(OBu^t) — GLN — SER — ALA — GLU(OBu^t) — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU(OBu^t) — FEN — OBu^t. (15—39).

600 mg (0,286 milimola) chronionego pentadeka-peptydu, otrzymanego w etapie 13, uwodorniano w 20 ml kwasu octowego wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, przesącz odparowano, pozostałość rozcieńczono eterem etylowym, przesączono i wysuszono. Otrzymano 490 mg (85% wydajności teoretycznej) pentadeka-peptydu z wolnym końcowym N.

Rf¹ 0,50—0,55; Rf¹⁰ 0,25—0,30.

Produkt otrzymany w powyższy sposób (0,242 milimola) oraz 515 mg (0,242 milimola) chronionego aktywnego estru deka-peptydu, otrzymanego w etapie 26, rozpuszczono razem w 3,0 ml dwumetyloformamidu i pozostawiono dla przereagowania na okres 48 godzin w temperaturze 50°C. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono eterem etylowym, następnie surowy produkt wytrącono trzykrotnie z 70% wodnego roztworu metanolu i w końcu rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 460 mg (50% wydajności teoretycznej) chronionego pentakozapeptydu.

Rf² 0,42—0,47; Rf¹⁰ 0,55—0,60.

366 mg (0,00965 milimola) tego chronionego pentakozapeptydu uwodorniano w 100 ml 80% kwasu octowego wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji (co można poznać w ten sposób, że na chromatogramie widać tylko plamę Rf¹ 0,23—0,27) katalizator odsączono i przesącz odparowano. Pozostałość po odparowaniu oziębiono lodem, następnie rozcieńczono 10 ml 0,1 normalnego kwasu solnego, po czym dodano 10 ml 15% roztworu chlorku sodu, przesączono, przemyto zimną wodą i wysuszono. Otrzymano 225 mg (63% wydajności teoretycznej) trójchlorowodoru pentakozapeptydu.

Rf¹ 0,23—0,27; Rf⁷ 0,34—0,40.

C₁₇₃H₂₆₄O₄₅N₃₅Cl₃ (3679,65).

Etap 28: Z — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI OEt (9—14).

4,95 g estru czteropeptydu Z — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — OEt (R. Schwytzer, W. Rittel: *Helv. Chim. Acta* 44, 159 (1961) rozpuszczono w etanolu i poddano wodorolizie wobec palla-

du na węglu aktywnym w celu odszczepienia ochronnych grup karbobenzoksy. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono i przesącz odparowano. Otrzymany jako pozostałość ester czteropeptydu z wolnym końcowym N (R_f^1 0,40—0,50) rozpuszczono w 7,5 ml dwumetyloformamidu, następnie dodano do roztworu mieszaniny bezwodnik, otrzymany w sposób opisany niżej.

2,95 g dwupeptydu Z — TRY — GLI — OH (K. Hofmann, M. E. Woolner, G. Spühler i E. T. Schwarz: J. Am. Chem. Soc. 80, 1486 (1958) rozpuszczono w 7,5 ml dwumetyloformamidu, do roztworu dodano 1,05 ml trójetiloaminy a po oziębieniu do temperatury -10°C dodano jeszcze 0,99 ml chlorowęgla izobutyli. Po 15 minutach mieszanina, otrzymana w ten sposób mieszanina bezwodnik, dodano do wzmiankowanego wyżej roztworu estru czteropeptydu. Połączone roztwory pozostawiono na noc, następnie odparowano a pozostałość rozpuszczono w octanie etylu. Roztwór w octanie etylu przemyto w temperaturze 0°C rozcieńczonym kwasem solnym, następnie wodą, potem 10% roztworem wodorowęglanu sodu i w końcu ponownie wodą. Roztwór wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu i odparowano, pozostałość rozcieńczono eterem etylowym, przesączono i wysuszono. Surowy, chroniony ester heksapeptydu rozpuszczono w bezwodnym octanie etylu przez gotowanie, następnie wytrącono produkt po oziębieniu roztworu odsączono, przemyto zimnym, bezwodnym octanem etylu i wysuszono $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$ ($C = 1$, w etanolu. R_f^{12} 0,13—0,22, R_f^4 0,48—0,59. Po solwolicie kwasem trójfluorooctowym: R_f^1 0,44—0,50.

Analiza: $C_{46}H_{64}O_{11}N_8$ (905,04)

Obliczono: C 61,05%, H 7,13%, N 12,4%

Otrzymano: C 61,05%, H 7,35%, N 12,4%

Etap 29: Z — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLY — OEt. HCl (8—14).

3,5 g chronionego estru heksapeptydowego, otrzymanego w etapie 28, poddano wodorolizie w roztworze etanolowym, wobec palladu na węglu aktywnym, w celu odszczepienia ochronnych grup karbobenzoksy. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono przesącz odparowano. Otrzymany, jako pozostałość, olej ($R_f^1 = 0,54—0,64$) oraz 1,33 g chlorowodorku karbobenzoksy — 1 argininy rozpuszczono w mieszaninie 3,9 ml pirydyny i 3,9 ml dwumetyloformamidu. Do roztworu dodano 1,2 dwucykloheksylokarbodiimidu i pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji dwucykloheksylokarbodiimid odsączono, przesącz odparowano, pozostałość rozpuszczono w chloroformie. Roztwór przemyto w temperaturze 0°C rozcieńczonym kwasem solnym, następnie wodą, wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu i odparowano. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczono ponownie w chloroformie i wytrącono przez dodanie eteru etylowego. Osad przesączono, przemyto eterem etylowym i wysuszono. Otrzymano 3,6 g (84,5% wydajności teoretycznej) chronionego chlorowodorku estru heptapeptydu. R_f^1 0,43—0,53; R_f^{10} 0,1—0,25. $[\alpha]_D^{20} = -41^\circ$ $C = 1$, w etanolu).

Analiza: $C_{52}H_{77}O_{12}N_{12}Cl$ (1097,69)

Obliczono: C 56,9%, H 7,1%, N 15,3%, Cl 3,25%

Otrzymano: C 56,55%, H 7,1%, N 15,3%, Cl 2,9%

Etap 30: Z — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — OH. HCl (8—14).

9,9 g chronionego chlorowodorku estru heptapeptydu, otrzymanego w etapie 29, rozpuszczono w metanolu, dodano 18 ml normalnego roztworu wodorotlenku sodu, pozostawiono w ciągu 1 godziny i następnie zobojętniono 1,08 ml lodowatego kwasu octowego. Roztwór odparowano a pozostałość rozdzielono metodą chromatograficzną za pomocą mieszaniny octanu etylu, pirydyny, kwasu octowego i wody (60:20:6:11) w kolumnie zawierającej 200 g żelu krzemionkowego (3×70). Frakcje zawierające czysty produkt główny zebrano razem, odparowano a pozostałość rozpuszczono w mieszaninie chloroformu butanolu (1:1), następnie przemyto 0,5 normalnym kwasem solnym w temperaturze 0°C , potem wodą i wysuszono. Po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość rozcieńczono eterem. Otrzymano 6,15 g (64% wydajności teoretycznej) chronionego chlorowodorku heptapeptydu. R_f^1 0,14—0,20.

$[\alpha]_D^{20} = -29^\circ$ ($C = 1$, w etanolu).

Analiza: $C_{50}H_{73}O_{12}N_{12}Cl$ (1069,64)

Obliczono: C 56,14%, H 6,88%, N 15,72%

Otrzymano: C 56,2%, H 7,0%, N 15,7%

Etap 31: H — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — OH. HCl (8—14).

6,0 g chronionego chlorowodorku heksapeptydu, otrzymanego w etapie 30, rozpuszczono w etanolu i uwodorniano wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, roztwór odparowano i pozostałość po odparowaniu rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 4,25 g (81,5% wydajności teoretycznej) chlorowodorku heptapeptydu.

R_f^1 0,04—0,014; R_f^7 0,50—0,58. Po solwolicie kwasem trójfluorooctowym: R_f^1 0,0; R_f^7 0,33—0,41 $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ$ ($C = 1$, w etanolu).

Analiza: $C_{42}H_{67}O_{10}N_{12}Cl$ (935,51)

Obliczono: N 17,97%, Cl 3,8%;

Otrzymano: N 18,0%, Cl 3,7%

Etap 32: Z — GLU(OBu^t) — HIS — FEN — OMe (5—7).

11,8 g chronionego dwupeptydu (St. Guttman, R. A. Boissonnas: Helv. Chim. Acta 41, 1852 (1958) rozpuszczono w metanolowym roztworze 1,04 g kwasu solnego i poddano wodorolizie wobec palladu na węglu aktywnym, w celu odszczepienia ochronnych grup karbonylobenzenooksy-. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, roztwór odparowano i krystaliczną pozostałość przekrystalizowano z mieszaniny metanolu i eteru etylowego. Otrzymano 6,4 g (70% wydajności teoretycznej) chlorowodorku estru dwupeptydu.

Otrzymany produkt oraz 6,87 g estru γ -III-rzęd.-butylo- α -(p-nitrofenyloвого) kwasu karbonylobenzenooksy glutaminowego rozpuszczono w 90 ml dwumetyloformamidu, do roztworu dodano 2,8 ml trójetiloaminy i pozostawiono na okres 2 dni

w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną odparowano, pozostałość rozpuszczono w mieszaninie octanu etylu i wody. Warstwę wodną oddzielono a roztwór organiczny przemyto 5% wodnym roztworem trójetyloaminy, następnie wodą, wysuszono i odparowano. Pozostałość po odparowaniu przekrystalizowano z mieszaniny metanolu i wody. Otrzymano 7,5 g (78% wydajności teoretycznej) chronionego estru trójpeptydu. Temperatura topnienia 180–182°C.

Etap 33: Z — GLU(OBu^t) — HIS — FEN — N₂H₅ (5–7).

12,7g chronionego estru trójpeptydu, otrzymanego w etapie 32, rozpuszczono w metanolu, do roztworu dodano 3,2 ml 94% roztworu wodzianu hydrazyny w temperaturze pokojowej i pozostawiono na okres 3 dni w temperaturze pokojowej. Następnie rozpuszczalnik odparowano a pozostałość wysuszono w próżni nad stężonym kwasem siarkowym. Otrzymany produkt w postaci piany przekrystalizowano z mieszaniny etanolu i wody (1:1). Otrzymano hydrazyd trójpeptydu. Temperatura topnienia 209–210°C.

Etap 34: Z — GLU(OBu^t) — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — OH (5–14).

3,2 g chronionego estru trójpeptydu, otrzymanego w etapie 33 rozpuszczono w 9,0 ml dwumetyloformamidu, do roztworu dodano najpierw, w temperaturze –30°, najpierw roztwór 720 mg chlorowodoru w 10 ml czterowodorofuranu, następnie 0,84 ml azotynu izoamyloвого a po 5 minutach mieszania 4,0 ml trójetyloaminy. Następnie 5,4 g hepapeptydu, otrzymanego w etapie 31, w 12,0 ml dwumetyloformamidu dodano do roztworu azydu otrzymanego wyżej opisanym sposobem. Mieszaninę reakcyjną mieszano w ciągu godziny w temperaturze między –10°C i –20°C, następnie pozostawiono na noc w temperaturze 0°C. Po odparowaniu mieszaniny reakcyjnej pozostałość rozcieńczono wodą, wysuszono i suchy, surowy produkt oczyszczono chromatograficznie za pomocą mieszaniny octanu etylu, pirydyny, kwasu octowego i wody (60:20:6:11) w kolumnie zawierającej 140 g żelu krzemionkowego. Frakcje zawierające czysty produkt główny zebrano, odparowano i pozostałość rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 4,0 g chronionego dekapeptydu Rf¹ 0,15–0,20.

Etap 35: H — GLZ(OBu^t) — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — OH. HCl (15–14).

3,5 g chronionego dekapeptydu otrzymanego w etapie 34, uwodorniono w roztworze 80 ml metanolu, 10 ml wody i 1 ml lodowatego kwasu octowego wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, przesącz odparowano i pozostałość po rozpuszczeniu w 10 ml metanolu wytrącono przez dodanie 100 ml eteru etylowego. Osad odsączono i wysuszono. Otrzymano 3,0 g (100% wydajności teoretycznej) wolnego dekapeptydu. Rf¹ 0,05–0,10.

Etap 36: BOC — SER — TYR — SER — MET — GLU(OBu^t) — HIS — HEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — OH. HCl (1–14).

3,1 g hydrazidu cztero-peptydu BOC — SER — TYR — SER — MET — N₂H₅ (B. Iselin, R. Schwyzer: *Helv. Chim. Acta* 44, 169 (1961) rozpuszczono w 15 ml dwumetyloformamidu, do roztworu oziębionego do temperatury –30°C dodano 2,35 ml 6 normalnego kwasu solnego a następnie stężony wodny roztwór 410 mg azotynu sodu. Otrzymany w ten sposób roztwór azydu dodano natychmiast do oziębionego do temperatury –20°C roztworu, 3,5 g dekapeptydu, otrzymanego w etapie 35, oraz 2,1 ml trójetyloaminy w 15 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w ciągu 1 godziny w temperaturze od –10° do –20°C, następnie pozostawiono na noc w temperaturze 0°C. Po odparowaniu mieszaniny reakcyjnej pozostałość roz tarto na proszek z wodą i rozdzielono metodą chromatograficzną za pomocą mieszaniny octanu etylu, pirydyny, kwasu octowego i wody (60:20:6:11) w kolumnie zawierającej 150 g żelu krzemionkowego. Frakcje zawierające produkt główny w czystym stanie zebrano i odparowano. Pozostałość po doparowaniu rozpuszczono przez dodanie 1–2 g chlorowodoru pirydyny w 20–30 ml metanolu i roztwór zateżono. Produkt wytrącono przez dodanie wody, roz tarto na proszek, przesączono, przemyto wodą i wysuszono. Rf¹ 0,10–0,15.

C₈₁H₁₃₄O₂₃N₂₂SCl (1971,68).

Analiza aminokwasów (w nawiasach podano wartości teoretyczne:

SER 1,95 (2), TYR 0,95 (1), MET 1,0 (1), GLU 1,0 (1), HIS 1,05 (1), FEN 1,0 (1), ARG 0,95 (1), GLI 2,0 (2), LIZ 1,05 (1), PRO 0,95 (1), WAL 1,05 (1).

Etap 37: BOC — SER — TYR — SER — MET — GLU(OBu^t) — HIS — FEN — ARG — TRY — 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) — ASP — (OBu^t) — GLN — SER — ALA — GLU(OBu^t) — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU(OBu^t) — FEN — OBu^t. 3 HCOOH (1–39).

202 mg (0,055 milimola) trójchlorowodoru pentakozapeptydu, otrzymanego w etapie 23, 118 g (0,060 milimola) chronionego tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36, 38 mg (0,144 milimola) pięcioklorofenolu i 30 mg (0,145 milimola) dwucyklohesylokarbodwuimidu rozpuszczono w 0,6 ml dwumetyloformamidu, który zawierał 0,077 ml (0,055 milimola) trójetyloaminy. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej na okres 4 dni, następnie rozcieńczono eterem etylowym nie zawierającym nadtlenu i wysuszono. Surowy produkt, otrzymany w ten sposób rozdzielono w kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym stosując mieszaninę octanu etylu, pirydyny kwasu mrówkowego i wody. Frakcje zawierające produkt główny w czystym stanie zebrano razem,

odparowano a pozostałość roztarto z eterem etylowym wolnym od nadtlenu. Frakcje zawierające produkt główny razem z innymi substancjami również zebrano razem i z nich otrzymano za pomocą chromatografii dalsze ilości pożądanego produktu. W ten sposób otrzymano razem 136 mg (44% wydajności teoretycznej) chronionego nonatriakontapeptydu.

Rf¹ 0,31—0,37.

C₂₈₇H₄₁₈O₇₃N₅₇S (5622,54).

Etap 38: SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — LIZ — LIZ — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ — WAL — TYR — PRO — ASP — ALA — GLI — GLU — ASP — GLN — SER — ALA — GLU — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU — FEN (α_nACTH).

100 mg chronionego nonatriakontapeptydu, otrzymanego w etapie 37 rozpuszczono w 2 ml kwasu trójfluorooctowego, roztwór pozostawiono przez 15 minut i następnie odparowano pod próżnią. Rozpuszczanie w wodzie i odparowanie powtórzone, po czym pozostałość rozpuszczono w 5 ml wody i roztwór przepuszczono przez kolumnę jonowymienną z żywicą Amberlite IRA — 400 (w cyklu octanowym) po czym kolumnę przemyto 20 ml wody. Połączone roztwory wodne poddano liofilizacji. Jako liofilizat otrzymano 80 ml (około 80% wydajności teoretycznej) wolnego nonatriakontapeptydu, identycznego z ludzką kortykotropiną. Rf⁶ 0,23—0,30.

Analiza aminokwasów: ASP 1,8 (2), SER 2,7 (3), GLU 4,5 (5), PRO 3,8 (4), GLI 2,9 (3), ALA 3,0 (3), LEU 1,0 (1), WAL 2,9 (3), MET 0,95 (1), TYR 1,9 (2), FEN 3,0 (3), HIS 0 (1), LIZ 3,8 (4), ARG 2,8 (3), TYR: TRY 2,2 (2).

Przykład II. Modyfikacja sposobu wytwarzania ludzkiej kortykotropiny.

Etap 1: Z — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR (Bu^t) — PRO — OSu (20—24).

51,5 g pięciopeptydu Z — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — OH otrzymanego w etapie 23 w przykładzie I, oraz 13,2 g imidu N-hydroksyburstynowego rozpuszczono w 400 ml bezwodnego dioksanu, następnie do roztworu oziębionego lodem dodano 12,1 g dwucykloheksylokarbodiimidu. Mieszaninę oziębiono w ciągu pół godziny po czym zostawiono do następnego dnia w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu mieszaniny reakcyjnej w próżni, pozostałość rozpuszczono w 1 litrze octanu etylu, po czym roztwór przemyto trzykrotnie, za każdym razem 300 ml 2% roztworu wodorowęglanu sodu. Po wysuszeniu z fazy organicznej oddestylowano octan etylu pod próżnią, pozostałość rozcieńczono bezwodnym eterem etylowym, przesączono i wysuszono w próżni nad pięciotlenkiem fosforu. Otrzymano 49,0 g (86% wydajności teoretycznej) aktywnego estru pięciopeptydu. Temperatura topnienia 171—173°C.

Etap 2: Z — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR (Bu^t) — PRO — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — OH (20—27).

Z 130 mg drobno sproszkowanego trójepeptydu H — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — OH, otrzymanego w etapie 11 w przykładzie I, sporządzono zawiesinę w 3,6 ml bezwodnego dwumetyloformamidu, zawierającego również 36 mg trójetiloaminy. Do zawiesiny dodano podczas mieszania, 365 mg aktywnego estru pentapeptydu Z — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — OSu, otrzymanego w etapie 1 w przykładzie II, mieszaninę mieszano w ciągu 12 godzin w temperaturze pokojowej, przy czym trójepeptyd powoli rozpuszczał się. Mieszaninę pozostawiono następnie na okres 36 godzin, po czym odparowano do sucha w próżni. Pozostałość rozpuszczono w 3 ml mieszaniny octanu etylu, pirydyny, kwasu octowego i wody 120 : 20 : 6 : 11 i rozdzielono w kolumnie chromatograficznej 20×250 mm, wypełnionej żelalem krzemionkowym, po czym eluowano tę samą mieszaninę rozpuszczalników. Frakcje zawierające czysty produkt zebrano razem, odparowano pod próżnią a pozostałość roztarto z wodą na proszek. Po wysuszeniu w eksykatorze nad pięciotlenkiem fosforu otrzymano 304 mg (70% wydajności teoretycznej) chronionego oktapeptydu.

Rf² 0,50—0,55; Rf¹¹ 0,55—0,60.

C₈₀H₉₁O₁₆N₉ (1194,45).

Etap 3: Z — WAL — LIZ(BOC) — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — GLU(OBu^t) — ASP(OBu^t) — GLN — SER — ALA — GLU(OBu^t) — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU(OBu^t) — FEN — OBu^t (20—39).

120 mg (0,1 milimola) chronionego oktapeptydu, otrzymanego w etapie 2 w przykładzie II, rozpuszczono w 2 ml bezwodnego dioksanu, następnie dodano 23 mg (0,2 milimola) imidu N-hydroksyburstynowego a potem 25 mg (0,12 milimola) dwucykloheksylokarbodiimidu. Mieszaninę pozostawiono na okres 24 godzin w temperaturze pokojowej po czym wytrącony dwucykloheksylokarbodiimid odsączono a przesącz odparowano. Produkt wykazał, przy badaniu metodą chromatografii cienkowarstwowej, nie więcej niż 5% zawartości nieprereagowanego, wyjściowego oktapeptydu; Rf⁶ otrzymanego, aktywnego estru oktapeptydu: 0,85—0,95.

Aktywny ester oktapeptydu, otrzymany w powyższy sposób, rozpuszczono bez dalszego oczyszczania w 1 ml dwumetyloformamidu, następnie w roztworze tym rozpuszczono 170 mg (0,1 milimola) chlorowodoru dodekapeptydu, otrzymanego w etapie 7 w przykładzie I, po czym dodano roztwór 30 mg (0,3 milimola) trójetiloaminy w 0,5 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej, po czym rozpuszczalnik oddestylowano pod próżnią, pozostałość rozcieńczono wodą, odsączono i wysuszono w eksykatorze. Otrzymano 222 mg trudno rozpuszczalnego ikozapeptydu. W produkcie nie wykryto stosowanego jako substancję wyjściową, aktywnego estru ani odpowiedniego, wolnego kwasu, jak również nie wykryto zanieczyszczeń reagujących dodatnio z ninhydriną. Metodą chromatografii cienkowarstwowej otrzymano: w 90% kwasie octowym: Rf 0,75—0,85.

C₁₄₂H₂₁₆O₃₈N₂₂ (2839,03).

Etap 4: H — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR (But) — PRO — ASP(OBut) — ALA — GLU(OBut) — ASP(OBut) — GLN — SER — ALA — GLU(OBut) — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU(OBut) — FEN — OBut (20—39).

100 mg chronionego ikozapeptydu, otrzymanego w etapie 3, rozpuszczono w 10 ml 80% kwasu octowego i uwodorniano wobec 70 mg, 10% palladu na węglu aktywnym w ciągu 3 godzin. Po odsączeniu katalizatora przesącz odparowano pod próżnią a pozostałość wysuszono w eksykatorze nad wodorotlenkiem sodu. Otrzymano 90 mg wolnego estru ikozapeptydu w postaci szklistych, amorficznych łusek. Produkt był jednolity chromatograficznie i wykazywał słabą, dodatnią reakcję na ninhydrynę; nie zawierał chronionego ikozapeptydu. R_f^1 0,76—0,84; R_f^{11} 0,47—0,53.

$C_{134}H_{210}O_{36}N_{22}$ (2704,90).

Etap 5: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO_2) — ARG(NO_2) — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(But) — PRO — ASP(OBut) — ALA — GLI — GLU(OBut) — ASP(OBut) — GLU — SER — ALA — GLU(OBut) — ALA — FEN — PRO — LEU — GLU(OBut) — FEN — OBut (15—39).

90 mg ikozapeptydu otrzymanego w etapie 4 rozpuszczono w 1,0 ml dwumetyloformamidu, zawierającego 6 mg trójetiloaminy. Do roztworu dodano 45 mg chronionego estru pięciochlorofenylowego pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 17/b w przykładzie I, i pozostawiono na okres 3 dni w temperaturze pokojowej. Następnie rozpuszczalnik odparowano pod próżnią i otrzymano, jako pozostałość, produkt oczyszczony od nieprzereagowanego ikozapeptydu oraz od małej ilości aktywnego estru pięciopeptydu w kolumnie chromatograficznej z żelalem krzemionkowym stosując następujący układ rozpuszczalników: octan etylu — pirydyna — lodowaty kwas octowy — woda 120 : 20 : 6 : 11 lub chloroform — metanol 80 : 20.

Otrzymano 54 mg (40% wydajności teoretycznej) chronionego estru pentakozapeptydu. R_f^2 0,42—0,47. R_f^{10} 0,55—0,60. Produkt ten można uwolnić od grup ochronnych w sposób opisany w etapie 27 w przykładzie I i stosować w reakcji sprzęgania z chronionym tetradekapeptydem (1—14) według etapu 37 w przykładzie I.

Przykład III. Sposób wytwarzania fragmentu kortykotropiny (1—14) H — SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — OH.

200 mg chronionego tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, rozpuszczono w 5,0 ml kwasu trójfluorooctowego, zawierającego 0,02% merkaptotetanolu. Roztwór odparowano po 20 minutach w próżni, pozostałość rozpuszczono w 5 ml wody i przeniesiono do kolumny zawierającej 5 ml żywicy jonowymiennej Amberlite IRA — 410 (w cyklu octanowym) i eluowano 5×3 ml wody. Połączone roztwory wodne poddano liofilizacji. Otrzymano 180 mg wolnego tetradekapeptydu. R_f^6 0,45—0,50.

Analiza aminokwasów: SER 1,95 (2), TYR 0,95 (1), MET 1,0 (1), GLU 1,0 (1), HIS 1,05 (1), FEN 1,0 (1), ARG 0,95 (1), GLI 2,0 (2), LIZ 1,05 (1), PRO 0,95 (1), WAL 1,05 (1).

Przykład IV. Sposób wytwarzania fragmentu kortykotropiny (1—14 — amid).

Etap 1: BOC — SER — TYR — SER — MET — GLU(OBut) — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — $NH_2 \cdot HCl$.

197 mg chronionego chlorowodoru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, rozpuszczono w 0,5 ml dwumetyloformamidu, zawierającego 5 mg amoniaku, następnie dodano 60 mg dwucykloheksylo karbodwuimidu i pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Następnego dnia powtórzono w ten sam sposób dodawanie amoniaku po czym do mieszaniny reakcyjnej dodano dalsze 60 mg dwucykloheksylo karbodwuimidu. Po 2 dniach roztwór rozcieńczono eterem etylowym nie zawierającym nadtlenu, wytrącony produkt odsączono i oczyszczono w kolumnie chromatograficznej, zawierającej żel krzemionkowy, stosując następujący układ rozpuszczalników: octan etylu — pirydyna — kwas octowy — woda 60 : 20 : 6 : 11. Otrzymano 150 mg (75% wydajności teoretycznej) chronionego amidu tetradekapeptydu. R_f^1 0,20—0,25.

Etap 2: H — SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — NH_2 (1—14)

Ze 100 mg amidu tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 1, usunięto grupy ochronne w sposób podany w przykładzie III. Otrzymano 60 mg (70% wydajności teoretycznej) wolnego amidu tetradekapeptydu. R_f^6 0,55—0,60.

Przykład V. Sposób wytwarzania fragmentu kortykotropiny

Etap 1: Z — LIZ(BOC) — NH_2 (1—15 — amid).

2,5 g aktywnego, chronionego estru lizyny Z — LIZ(BOC) — ONP rozpuszczono w 25 ml metanolu i po dodaniu 1,5 ml stężonego roztworu wodorotlenku amonu pozostawiono na noc. Następnie roztwór odparowano, otrzymane kryształy przemyto rozcieńczonym roztworem amoniaku i przekrystalizowano z mieszaniny 20 ml etanolu i 30 ml wody. Otrzymano 1,35 g (71% wydajności teoretycznej) chronionego amidu lizyny. Temperatura topnienia 140—141°C. R_f^4 0,6.

Etap 2: H — LIZ(BOC) — NH_2 .

800 mg chronionego amidu lizyny, otrzymanego w etapie 1, uwodorniano w 40 ml metanolu wobec palladu na węglu aktywnym, następnie roztwór, po odsączeniu katalizatora, odparowano a pozostałość wykrysztalizowano. Otrzymano 440 mg (86% wydajności teoretycznej) wolnego amidu lizyny H — LIZ — (BOC) NH_2 . R_f^1 0,34.

Analiza: $C_{11}H_{23}N_3O_3$ (245,33)

Obliczono: Amid — N 5,7%;

Otrzymano: Amid — N 5,5%.

Etap 3: BOC — SER — TYR — SER — MET —
GLU(OBu^t) — HIS — FEN — ARG —
TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO —
WAL — GLI — LIZ(BOC) — NH₂ (1—15).

40 mg amidu lizyny, otrzymanego w etapie 2, oraz 197 mg chronionego chlorowodorku tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, rozpuszczono w 0,5 ml dwumetyloformamidu. Do roztworu dodano 53 mg pięciochlorofenolu i 45 mg dwucykloheksylo karbodwuimidu i pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono bezwodnym eterem etylowym, otrzymany osad odsączono, przemyto eterem etylowym i rozdzielono w kolumnie chromatograficznej z żelom krzemionkowym. Frakcje zawierające produkt główny połączono, odparowano a pozostałość rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 120 mg (60% wydajności teoretycznej) chronionego amidu pentadekapeptydu. Rf¹ 0,2—0,25.

Etap 4: H — SER — TYR — SER — MET —
GLU — HIS — FEN — ARG — TRY —
GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI —
LIZ — NH₂.

Z 100 mg chronionego amidu pentadekapeptydu, otrzymanego w etapie 3, usunięto grupy ochronne w sposób opisany w przykładzie III. Otrzymano wolny amid pentadekapeptydu z wydajnością bliską ilościowej. Rf⁶ 0,45—0,55.

Przykład VI. Sposób wytwarzania fragmentu kortykotropiny (1—16 — amid.).

Etap 1: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — NH₂ (15—16).

2,0 g chronionego estru dwupeptydu Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — OMe [patrz R. Schwyzer, W. Rittel: *Helv. Chim. Acta* 44, 159 (1961)] rozpuszczono w 50 ml metanolu, następnie roztwór nasyciono gazowym amoniakiem. Mieszaninę pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej, następnie odparowano. Krystaliczną pozostałość przekrystalizowano z małej ilości metanolu. Otrzymano 1,6 g (83% wydajności teoretycznej) chronionego amidu dwupeptydu. Temperatura topnienia 160—162°C. Rf 0,0 (chloroform — metanol 98:2; wartość dla estru 0,20—0,25).

Etap 2: H — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — NH₂ (15—16).

1,0 g chronionego amidu dwupeptydu, otrzymanego w etapie 1, uwodorniono w roztworze metanolowym wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono i roztwór odparowano. Otrzymano 0,75 g (około 100% wydajności teoretycznej) wolnego amidu dwupeptydu w postaci krystalicznej pozostałości. Rf¹ 0,7 (dla chronionego amidu dwupeptydu 1,0); Rf⁷ 0,7.

Etap 3: BOC — SER — TYR — SER — MET —
GLU(OBu^t) — HIS — FEN — ARG —
TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO —
WAL — GLI — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) —
NH₂ (1—16).

197 mg chronionego chlorowodorku tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, 60 mg wolnego amidu dwupeptydu, otrzymanego w etapie 2, 50 mg pięciochlorofenolu i 45 mg dwucykloheksylo karbodwuimidu rozpuszczono w 0,5 ml dwumetyloformamidu. Roztwór pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej, następnie rozcieńczono eterem etylowym nie zawierającym nadtlenków. Wytrącony produkt odsączono i rozdzielono w kolumnie chromatograficznej zawierającej żel krzemionkowy stosując następującą mieszaninę rozpuszczalników octan etylu — pirydyna — kwas octowy — woda 60:20:6:11. Otrzymano 125 g (50% wydajności teoretycznej) chronionego amidu heksadekapeptydu. Rf¹ 0,20—0,25.

Etap 4: H — SER — TYR — SER — MET —
GLU — HIS — FEN — ARG — TRY —
GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI —
LIZ — LIZ — NH₂ (1—16).

Z 100 mg chronionego amidu heksadekapeptydu, otrzymanego w etapie 3, usunięto grupy ochronne w sposób opisany w przykładzie III. Otrzymano 70 mg (około 80% wydajności teoretycznej) wolnego amidu heksadekapeptydu. Rf⁶ 0,35—0,40.

Przykład VII. Sposób wytwarzania fragmentu kortykotropiny (1—17 — amid.).

Etap 1: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO₂) — NH₂ (15—17).

a). Otrzymywanie azydu: 3,12 g chronionego hydrazidu dwupeptydu Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — N₂H₃, otrzymanego w etapie 15 w przykładzie I, rozpuszczono w 50 ml dwumetyloformamidu, po czym dodano w temperaturze około -10°C 20 ml roztworu 0,5 normalnego kwasu solnego, następnie 5,0 ml 1 normalnego roztworu azotynu sodu. Mieszaninę mieszano w temperaturze około -10°C w ciągu 15 minut, następnie zobojętniono 1,0 ml trójetylemami i rozcieńczono 50 ml oziębionego chloroformu i 50 ml wody. Po oddzieleniu warstwy chloroformowej, warstwę wodną przemyto ponownie chloroformem. Roztwory chloroformowe połączono przemyto zimną wodą, wysuszono nad siarczanem magnezu i poddano reakcji ze składnikiem aminowym w sposób opisany niżej:

b). Sprzęganie: 1,5 g bromowodorku amidu — nitro argininy [H. Otsuka, K. Inouy, M. Kanayama i F. Shinozaki: *Bull. Chem. Soc. Japan* 38, 1563 (1965)] rozpuszczono w 10 ml dwumetyloformamidu, dodano 0,77 ml trójetylemami następnie przesączono do tej mieszaniny roztwór azydu otrzymanego wyżej podanym sposobem. Z mieszaniny oddestylowano chloroform a otrzymaną jako pozostałość mieszaninę reakcyjną pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Następnie dwumetyloformamid oddestylowano pod próżnią, pozostałość rozpuszczono w 200 ml octanu etylu, roztwór przemyto w temperaturze 0°C 1 normalnym roztworem kwasu solnego, następnie wodą, po czym wysuszono i odparowano. Chroniony amid trójeptydu otrzymanego w postaci krystalicznej, sporządzono z niego szlam z pomocą octanu etylu, wysuszono i odparowano. Otrzymano 3,1 g (77% wydaj-

ności teoretycznej) chronionego amidu trójpeptydu. Temperatura topnienia 92–94°C. R_f^2 0,80–0,88.

Etap 2: H — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — $NH_2 \cdot 2HCl$ (15–17).

1,5 g chronionego amidu trójpeptydu, otrzymanego w etapie 1 uwodorniono w 75 ml kwasu octowego wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono i roztwór odparowano. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w chloroformie, dodano 1,0 g chlorowodoru pirydyny, produkt wytrącono przez dodanie eteru etylowego, następnie rozcieńczono eterem etylowym, rozpuszczono ponownie w 1 ml mieszaniny chloroform-metanol 60:38 i przeniesiono do kolumny z żelam krzemionkowym. Produkt rozdzielono chromatograficznie za pomocą mieszaniny chloroform — metanol — woda 60:38:10. Frakcje zawierające produkt główny połączono, odparowano a pozostałość rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 1,0 g (77% wydajności teoretycznej) dwuchlorowodoru amidu trójpeptydu. R_f^3 0,70–0,80. (Powstały podczas wodorolizy octan amonu przeprowadzono w chlorek amonu, który z mniejszą wartością R_f mikrował i przy chromatografii pozostawał).

Etap 3: BOC — SER — TYR — SER — MET — GLU(OBu^t) — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — NH_2 (1–17).

197 mg chronionego chlorowodoru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, 100 mg dwuchlorowodoru amidu trójpeptydu, otrzymanego w etapie 2, 53 mg pięciochlorofenolu i 46 mg dwucykloheksylo karbodwuimidu rozpuszczono w 0,5 ml dwumetyloformamidu, zawierającego 14 mg trójetyloaminy. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej, następnie rozcieńczono eterem etylowym. Wytrącony surowy produkt poddano rozdzielaniu chromatograficznemu w kolumnie z żelam krzemionkowym stosując następującą mieszaninę rozpuszczalników octan etylu — pirydyna — kwas mrówkowy — woda 40:20:6:5,5. Frakcje zawierające produkt główny zebrano, odparowano a pozostałość rozcieńczono octanem etylu. Otrzymano 149 mg (58% wydajności teoretycznej). R_f^5 0,38–0,43; R_f^7 0,08–0,13.

Etap 4: H — SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — LIZ — LIZ — ARG — NH_2 (1–17).

Z 100 mg chronionego amidu heptadekapeptydu, otrzymanego w etapie 3, usunięto grupy ochronne w sposób opisany w przykładzie III. Otrzymano 70 mg (około 75% wydajności teoretycznej) amidu heptapeptydu. R_f^6 0,30–0,35.

Przykład VIII. Sposób wytwarzania fragmentu kortykotropiny (1–18 — amid).

Etap 1: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO_2) — ARG(NO_2) — NH_2 (15–18).

Z 1,85 g chronionego hydrazidu dwupeptydu — Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — N_2H_4 , sporządzono roztwór azydowy w chloroformie, w sposób opisany w etapie 1a w przykładzie VII, który następnie dodano do roztworu otrzymanego w sposób następujący:

1,8 g pochodnej dwupeptydowej H — ARG (BO_2) — ARG(NO_2) — $NH_2 \cdot HBr$ (patrz H. Otsuka, K. Inouye, M. Kanayama, E. Shinozaki: Bull. Chem. Soc. Japan, 38, 1953 (1965) oraz 0,6 ml trójetyloaminy rozpuszczono w 8,0 ml dwumetyloformamidu, następnie dodano wyżej wzmiankowany roztwór azidu po czym mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość przeniesiono do kolumny z żelam krzemionkowym i rozdzielono chromatograficznie za pomocą mieszaniny octan etylu — pirydyna — kwas octowy — woda 60:10:3:5,5. Frakcje zawierające produkt główny w stanie czystym zebrano, odparowano a pozostałość rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 2,05 g (68% wydajności teoretycznej) chronionego amidu czteropeptydu. R_f^2 0,38–0,48.

Etap 2: H — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — $NH_2 \cdot 3HCl$ (15–18).

0,4 g amidu czteropeptydu, otrzymanego w etapie 1, poddano wodorolizie w 10,0 ml kwasu octowego wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono i roztwór odparowano. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w chloroformie i dodano 0,3 g chlorowodoru pirydyny, następnie produkt wytrącono przez dodanie eteru etylowego. Osad rozpuszczono w 0,5 ml mieszaniny chloroform — metanol 60:38 i przeniesiono do kolumny z żelam krzemionkowym po czym rozdzielono chromatograficznie za pomocą mieszaniny chloroform — metanol — woda 60:38:10. Frakcje zawierające produkt główny w czystej postaci zebrano, odparowano a pozostałość rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 0,3 g (86% wydajności teoretycznej) trójchlorowodoru amidu czteropeptydu. R_f^3 0,55–0,65.

Etap 3: BOC — SER — TYR — MET — GLU (OBu^t) — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — NH_2 (1–18).

103,5 mg chronionego chlorowodoru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, 65 mg wolnego trójchlorowodoru amidu czteropeptydu, otrzymanego w etapie 2, 26 mg pięciochlorofenolu i 21 mg dwucykloheksylo-karbodwuimidu rozpuszczono w 0,3 ml dwumetyloformamidu, zawierającego 7,6 mg trójetyloaminy. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej po czym rozcieńczono eterem etylowym, nie zawierającym nadtlenu. Wytrącony surowy produkt reakcji przeniesiono do kolumny z żelam krzemionkowym i rozdzielono chromatograficznie za pomocą mieszaniny octan

etylu — pirydyna — kwas mrówkowy — woda 40:20:6:5,5. Frakcje zawierające produkt główny w czystej postaci zebrano, odparowano a pozostałość rozcieńczono octanem etylu. Otrzymano 73 mg (51% wydajności teoretycznej) chronionego amidu okta-dekapeptydu. R_f^5 0,17—0,23.

Etap 4: H — SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — LIZ — ARG — ARG — NH₂ (1—18).

Z 50 g chronionego amidu okta-dekapeptydu, otrzymanego w etapie 3, usunięto grupy ochronne w sposób opisany w przykładzie III. Otrzymano wolny amid okta-dekapeptydu z wydajnością prawie ilościową.

Przykład IX. Sposób wytwarzania fragmentu kortykotropiny (1—19 — amid).

Etap 1: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO₂) — ARG(NO₂) — PRO — NH₂ (15—19).

a) 1,0 g chronionego estru p-nitrofenylowego pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 17 a w przykładzie I rozpuszczono w 10 ml metanolu, do roztworu dodano 3 ml stężonego roztworu amoniaku i pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną odparowano, pozostałość rozpuszczono w mieszaninie chloroformu i wody. Roztwór chloroformowy oddzielono, przemyto wodą, wysuszono i odparowano. Pozostałość po odparowaniu rozdzielono chromatograficznie w kolumnie z żelalem krzemionkowym stosując mieszaninę chloroform — metanol — woda 40:10:1. Frakcje zawierające produkt główny zebrano, odparowano i pozostałość rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 0,8 g (89% wydajności teoretycznej) chronionego amidu pentapeptydu.

R_f^2 0,25—0,35; R_f^8 0,30—0,40

b) 0,41 g chronionego estru pięcioklorofenylowego pentapeptydu, otrzymanego w etapie 17 b w przykładzie I, rozpuszczono w 4,1 ml metanolu i przeprowadzono w amid przez dodanie 1,2 ml stężonego roztworu amoniaku. Mieszaninę reakcyjną poddano przeróbce w sposób opisany w części a). Otrzymano 0,24 g (74% wydajności teoretycznej) chronionego amidu pentapeptydu. Produkt ten jest identyczny z produktem otrzymanym w części a).

Etap 2: H — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — NH₂·HCl (15—19).

0,5 g chronionego amidu pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 1 poddano wodorolizie w 45 ml lodowatego kwasu octowego wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono i roztwór odparowano. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w chloroformie i dodano 0,3 g chlorowodoru pirydyny, następnie produkt wytrącono przez dodanie eteru etylowego. Osad rozpuszczono w mieszaninie chloroformu i metanolu (60:38) i poddano chromatografii w kolumnie z żelalem krzemionkowym, stosując mieszaninę chloroform — metanol — woda 60:38:10. Frakcje zawierające produkt główny zebrano, odparowano

a pozostałość rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 0,4 g (89% wydajności teoretycznej) trójchlorowodoru pięciopeptydu. R_f^3 0,5—0,6.

Etap 3: BOC — SER — TYR — SER — MET — GLU(OBu^t) — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — NH₂ (1—19).

197 mg chronionego chlorowodoru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, 149 mg trójchlorowodoru pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 2, 56 mg pięcioklorofenolu i 45 mg dwucykloheksylo karbodwuimidu rozpuszczono w 0,5 ml dwumetyloformamidu, zawierającego 15 mg trójetyloaminy. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej, następnie rozcieńczono eterem etylowym nie zawierającym nadtlenków, otrzymano osad przeniesiono do kolumny z żelalem krzemionkowym i poddano chromatografii za pomocą mieszaniny octanu etylu — pirydyny — kwasu mrówkowego — wody 40:20:6:5,5. Po zwykłym oczyszczeniu otrzymano 144 mg (50% wydajności teoretycznej) chronionego amidu nonadekapeptydu. R_f^5 0,20—0,26.

Etap 4: H — SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — LIZ — LIZ — ARG — ARG — PRO — NH₂ (1—19).

Z 100 mg chronionego amidu nonadekapeptydu, otrzymanego w etapie 3, usunięto grupy ochronne w sposób opisany w przykładzie III. Otrzymano 60 mg (około 70% wydajności teoretycznej) wolnego amidu nonadekapeptydu. R_f^6 0,30—0,40.

Przykład X. Sposób wytwarzania fragmentu kortykotropiny (1—20 — amid).

Etap 1: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO₂) — ARG(NO₂) — PRO — WAL — NH₂ (15—20).

548,8 mg chronionego estru pięcioklorofenylowego pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 17 b w przykładzie I, oraz 0,15 g amidu waliny rozpuszczono w 1,0 ml dwumetyloformamidu, po czym roztwór pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu mieszaniny reakcyjnej, oleistą pozostałość oczyszczono metodą chromatograficzną w kolumnie z żelalem krzemionkowym, stosując mieszaninę octan etylu — pirydyna — kwas octowy — woda 60:10:3:3,5. Otrzymano 320 mg czystego, chronionego amidu heksapeptydu. R_f^2 0,4—0,5.

W podobny sposób można otrzymać ten chroniony amid heksapeptydu w reakcji 500 mg chronionego estru p-nitrofenylowego pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 17 a w przykładzie I, z 80 mg chlorowodoru amidu waliny i 50 mg trójetyloaminy. Po zastosowaniu zwykłej chromatografii otrzymano 430 mg (88% wydajności teoretycznej) chronionego amidu heksapeptydu. R_f^2 0,4—0,5.

Etap 2: H — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — WAL — NH₂·3HCl (15—20).

0,2 g amidu heksapeptydu, otrzymanego w etapie 1, poddano wodorolizie w 10 ml lodowatego kwasu octowego wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono i roztwór w lodowatym kwasie octowym odparowano. Pozostałość rozpuszczono w chloroformie, dodano 0,12 g chlorowodoru pirydyny i produkt wytrącono przez dodanie eteru etylowego. Osad rozpuszczono w 0,1 ml mieszaniny chloroform — metanol 60:38 i poddano chromatografii w kolumnie z żelalem krzemionkowym stosując mieszaninę chloroform — metanol — woda 60:38:10. Otrzymano 0,17 g trójchlorowodoru heksapeptydu (100% wydajności teoretycznej) R_f^3 0,42—0,50.

Etap 3: BOC — SER — TYR — SER — MET — GLU(OBu^t) — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — WAL-NH₂ (1—20).

197 mg chronionego chlorowodoru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, 128 mg trójchlorowodoru heksapeptydu, otrzymanego w etapie 2, 56 mg pięcioklorofenolu i 45 mg dwucykloheksylo karbodwuimidu rozpuszczono w 0,5 ml dwumetyloformamidu, zawierającego 11,7 mg trójetyloaminy. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 2 dni, po czym rozcieńczono eterem etylowym, nie zawierającym nadtlenu. Otrzymany osad poddano chromatografii w kolumnie z żelalem krzemionkowym stosując mieszaninę octan etylu — pirydyna — kwas mrówkowy — woda 40:20:6:5,5. Frakcje zawierające produkt główny w czystej postaci zebrano, odparowano a pozostałość rozcieńczono octanem etylu. Otrzymano 185 mg (61% wydajności teoretycznej) chronionego amidu ikozapeptydu. R_f^5 0,27—0,31.

Etap 4: H — SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — LIZ — LIZ — ARG — ARG — PRO — WAL — NH₂ (1—20).

Z 100 mg chronionego amidu ikozapeptydu usunięto grupy ochronne w sposób opisany w przykładzie III. Otrzymano 75 mg (87% wydajności teoretycznej) wolnego amidu ikozapeptydu. R_f^6 0,22—0,25.

Przykład XI. Sposób wytwarzania fragmentu kortykotropiny (1—21 — amid).

Etap 1: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO₂) — ARG(NO₂) — PRO — WAL — LIZ(BOC) — NH₂ (15—21).

a) 0,5 mg chronionego estru p-nitrofenylowego pięciopeptydu Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO₂) — ARG(NO₂) — PRO — ONP, otrzymanego w etapie 17a w przykładzie I, poddano reakcji z 0,17 g amidu dwupeptydu H — WAL — LIZ(BOC) — NH₂ w 1,0 ml dwumetyloformamidu [patrz K. Sturm, R. Geiger, W. Siedel: Ber. 97, 1197, (1964)]. Po dwóch dniach mieszaninę reakcyjną rozcieńczono eterem etylowym. Osad poddano chromatografii w kolumnie z żelalem krzemionko-

wym, stosując mieszaninę octan etylu — pirydyna — kwas octowy — woda 60:10:3:5,5. Otrzymano 0,52 g (89% wydajności teoretycznej) amidu heptapeptydu.

b) 877 mg chronionego estru pięcioklorofenylowego pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 17 b w przykładzie I, rozpuszczono w 1,5 ml dwumetyloformamidu, do roztworu dodano 478 mg amidu dwupeptydu H — WAL — LIZ(BOC) — NH₂ i mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej. Produkt reakcji wytrącono eterem etylowym i oczyszczono na żelu krzemionkowym. Otrzymano 713 mg (77% wydajności teoretycznej) chronionego amidu heptapeptydu. R_f^2 0,61—0,72; R_f^1 0,35—0,40.

Etap 2: H — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ(BOC) — NH₂·3HCl (15—21).

0,4 g chronionego amidu heptapeptydu, otrzymanego w etapie 1, poddano wodorolizie w 25 ml lodowatego kwasu octowego wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, roztwór odparowano i pozostałość rozpuszczono w chloroformie. Do roztworu chloroformowego dodano 0,3 chlorowodoru pirydyny, produkt wytrącono eterem etylowym, rozpuszczono w 0,5 ml mieszaniny chloroform — metanol 60:26 i poddano chromatografii w kolumnie z żelalem krzemionkowym, stosując mieszaninę chloroform — metanol — woda 60:26:5. Frakcje zawierające produkt główny w czystym stanie zebrano, odparowano a pozostałość rozcieńczono eterem. Otrzymano 0,35 g (89% wydajności teoretycznej) trójchlorowodoru heptapeptydu. R_f^1 0,07—0,10; R_f 0,45—0,50 w układzie chloroform — metanol — woda 60:26:5.

Etap 3: BOC — SER — TYR — SER — MET — GLU(OBu^t) — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ(BOC) — NH₂ (1—21).

197 mg chronionego chlorowodoru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, 152 g trójchlorowodoru amidu heptapeptydu, otrzymanego w etapie 2, 52 mg pięcioklorofenolu i 44 mg dwucykloheksylo karbodwuimidu rozpuszczono w 0,5 ml dwumetyloformamidu, zawierającego 11 mg trójetyloaminy, po czym pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono eterem etylowym, osad poddano chromatografii w kolumnie z 10 ml żelu krzemionkowego, stosując mieszaninę rozpuszczalników octan etylu — pirydyna — kwas mrówkowy — woda 40:20:6:5,5. Po zwykłej obróbce otrzymano 200 mg (61% wydajności teoretycznej) chronionego amidu heneikozapeptydu. R_f^5 0,35—0,40.

Etap 4: H — SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — LIZ — LIZ — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ — NH₂ (1—21).

Z 100 mg chronionego amidu heneikozapeptydu usunięto grupy ochronne w sposób opisany w przykładzie III. Otrzymano 75 mg (80% wydajności teoretycznej) wolnego amidu heneikozapeptydu. R_f 0,20—0,25.

Przykład XII. Sposób wytwarzania fragmentu (1—28) świńskiej kortykotropiny.

Etap 1: Z — GLI — ALA — GLU(OBu^t) — OBU^t (26—28 B).

58,1 g chronionego, aktywnego estru alaniny Z — ALA — ONSu (przy czym NSu oznacza resztę imidu bursztynowego) rozpuszczono w 150 ml bezwodnego dioksanu i dodano roztwór 54,4 g estru kwasu glutaminowego GLU(OBu^t) — OBU^t w 200 ml bezwodnego dioksanu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na godzinę w temperaturze pokojowej, następnie dodano 1 litr octanu etylu po czym wytrząsano kolejno z wodą, z 1 normalnym roztworem kwasu solnego, z 8% roztworem wodorowęglanu sodu i wreszcie ponownie z wodą. Warstwę organiczną wysuszono i poddano wodorolizie wobec palladu na węglu aktywnym, następnie otrzymany, wolny ester dwupeptydu ekstrahowanego 10% roztworem kwasu cytrynowego. Wodny roztwór zalkalizowano węglanem sodu aż do pH = 9, a wydzielony ester dwupeptydu w postaci oleistej, ekstrahowano eterem etylowym.

Po oddestylowaniu eteru, otrzymany jako pozostałość ester dwupeptydu ALA — GLU(OBu^t) — OBU^t, rozpuszczono w 1 litrze octanu etylu po czym dodano 45,8 g aktywnego estru glicyny Z — GLI — ONSu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono do następnego dnia w temperaturze pokojowej, po czym wytrząsano kolejno z 1 normalnym roztworem kwasu solnego, z 8% roztworem wodorowęglanu sodu i wreszcie z wodą, następnie wysuszono i octan etylu oddestylowano. Oleista pozostałość zakrzepła podczas stania pod warstwą eteru naftowego. Produkt przekrystalizowano z 250 ml eteru dwuizopropylowego. Otrzymano 65—66,5 g (83—85% wydajności teoretycznej) chronionego estru trójepeptydu. Temperatura topnienia 105—107°C [α] = -3,25 do 35,7° (C = 1, w etanolu).

Etap 2: Z — ASP(OBu^t) — ONSu (25B).

Sporządzono zawiesinę w rozdzielaczu z 58,6 g drobno sproszkowanej soli Z — ASP(OBu^t) — OH — dwucykloheksyloaminy w 250 ml eteru etylowego, po czym dodano mieszaninę 3,3 ml stężonego kwasu siarkowego i 200 ml wody i wytrząsano aż do rozpuszczenia się soli. Warstwę wodną wytrząsano następnie z eterem etylowym, połączone warstwy eterowe przemyto wodą, wysuszono i eter oddestylowano. Otrzymany jako pozostałość olej rozpuszczono w 250 ml bezwodnego dioksanu i dodano, chłodząc lodem, 13,4 g imidu N-hydroksybursztynowego i 22,4g dwucykloheksylokarboimidu. Mieszaninę pozostawiono do następnego dnia, następnie po odsączeniu dwucykloheksylomocznika roztwór w diaksanie odparowano pod próżnią, a otrzymany jako pozostałość olej pozostawiono do zakrzepnięcia pod warstwą eteru naftowego. Po przekrystalizowaniu ze 100 ml izopropanolu otrzymano 35—40 g (72—83% wydajności

teoretycznej) aktywnego estru kwasu asparagowego. Temperatura topnienia 148—150°C.

Etap 3: Z — ASP(OBu^t) — GLI — ALA — GLU(OBu^t) — OBU^t (25—28 B).

46 g chronionego trójepeptydu Z — GLI — ALA GLU(OBu^t) — OBU^t, otrzymanego w etapie 1, rozpuszczono w 550 ml 80% kwasu octowego i poddano wodorolizie wobec palladu na węglu aktywnym. Po odsączeniu katalizatora roztwór odparowano pod próżnią, po czym otrzymany jako pozostałość olej rozpuszczono w 500 ml wody, dodano 120 g chlorku sodu i zalkalizowano węglanem sodu aż do pH = 9. Wydzielony olej ekstrahowano octanem etylu, roztwór w kwasie octowym wysuszono i odparowano. Pozostałość rozpuszczono w mieszaninie 200 ml bezwodnego octanu etylu i 100 ml bezwodnego dioksanu po czym dodano 30,6 g aktywnego estru Z — ASP(OBu^t) — ONSu. Następnie mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 3 godziny po czym rozcieńczono 200 ml octanu etylu, przemyto wodą, następnie 1 normalnym roztworem kwasu solnego, 8% roztworem wodorowęglanu sodu i w końcu ponownie wodą, po czym wysuszono i odparowano pod próżnią. Olej otrzymany jako pozostałość wykrystalizował pod warstwą eteru naftowego. Otrzymano 38—40 g (75—79% wydajności teoretycznej) chronionego estru tetrapeptydowego. Temperatura topnienia 80—83°C.

Etap 4: H — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(OBu^t) — GLI — ALA — GLU(OBu^t) — OBU^t (20—28).

37,2 g chronionego estru czteroepetydu Z — ASP(OBu^t) — GLI — ALA — GLU(OBu^t) — OBU^t rozpuszczono w 400 ml 80% kwasu octowego i poddano wodorolizie wobec palladu na węglu aktywnym. Po odsączeniu katalizatora rozpuszczalnik oddestylowano pod próżnią, a olej, otrzymany jako pozostałość, rozpuszczono w 330 ml wody po czym roztwór zalkalizowano węglanem sodu aż do pH = 9. Wydzielony olej ekstrahowano octanem etylu, roztwór wysuszono i rozpuszczalnik oddestylowano pod próżnią. Otrzymany w ten sposób ester czteroepetydu rozpuszczono w 350 ml bezwodnego dioksanu, po czym dodano 48,9 g chronionego aktywnego estru pięcioepetydu Z — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ONSu, otrzymanego w etapie 1 w przykładzie II. Mieszaninę pozostawiono w ciągu 20 godzin w temperaturze pokojowej, po czym odparowano pod próżnią a pozostałość rozpuszczono w 700 ml octanu etylu. Roztwór przemyto wodą, następnie 10% roztworem kwasu cytrynowego, 8% roztworem wodorowęglanu sodu i wreszcie ponownie wodą; wysuszono i odparowano pod próżnią.

Otrzymany surowy ester karbonylobenzyluksy nonapeptydu rozpuszczono w 1 litrze 80% kwasu octowego i poddano wodorolizie wobec palladu na węglu aktywnym. Po odsączeniu katalizatora rozpuszczalnik oddestylowano pod próżnią a pozostałość rozpuszczono w 1 litrze octanu etylu. Roztwór przemyto dwukrotnie, za każdym razem 150 ml 10% roztworem kwasu cytrynowego, następnie przemyto 5% roztworem węglanu sodu, wysuszono po czym octan etylu oddestylowano. Pozosta-

łość stanowiła żywica, pachnąca rozpuszczalnikiem, którą roztarto z eterem naftowym, odsączono i wysuszono w próżni nad pięciotlenkiem fosforu. Otrzymano 49,5 g (77% wydajności teoretycznej) estru nonapeptydu. Temperatura topnienia 135–140°C.

$\lambda = 268 \text{ m}\mu$, $\log \varepsilon = 2,71$ (w etanolu)

Analiza: $\text{C}_{65}\text{H}_{108}\text{N}_{10}\text{O}_{17}$ (1301,60)

Obliczono: C 59,98%, H 8,36%, N 10,76%;

Otrzymano: C 59,25%, H 8,70%, N 10,66%.

Etap 5: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO_2) — ARG(NO_2) — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(O^tBu) — GLI — ALA — GLU(O^tBu) — O^tBu^t (15–28).

451 mg nonapeptydu, otrzymanego w etapie 4, i 426 mg chronionego estru p-nitrofenyloвого pięciopeptydu, otrzymanego w etapie 17/a, w przykładzie I, rozpuszczono w 0,7 ml dwumetyloformamidu po czym roztwór pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono eterem etylowym a otrzymany produkt wytrącono czterokrotnie z mieszaniny octanu etylu i eteru etylowego. Otrzymano 735 mg (88,5% wydajności teoretycznej) chronionego estru tetradekapeptydu.

Rf^2 0,75–0,85; Rf^4 0,26–0,36.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 65,7^\circ$ (C = 1, w metanolu).

Analiza: $\text{C}_{112}\text{H}_{183}\text{O}_{32}\text{N}_{25}$ (2391,78)

Obliczono: C 56,2%, H 7,7%, N 14,6%;

Otrzymano: C 56,05%, H 7,8%, N 14,5%.

Etap 6: H — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(O^tBu) — GLI — ALA — GLU(O^tBu) — O^tBu^t · 3HCl (15–28).

6,1 g chronionego estru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 5, uwodorniono w 300 ml lodowatego kwasu octowego wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, roztwór odparowano a pozostałość rozpuszczono w 50 ml wody i do oziębionego lodem roztworu dodano 20 ml 0,5 normalnego kwasu solnego. Peptyd wytrącono z wodnego roztworu przez dodanie 10 ml nasyconego roztworu chlorku sodu. Produkt odsączono i wysuszono. Następnie wysuszony produkt rozcieńczono mieszaniną 80 ml chloroformu i 80 ml etanolu, nierozpuszczalne sole nieorganiczne usunięto przez odsączenie. Roztwór odparowano a pozostałość rozdzielono chromatograficznie w kolumnie z żelem krzemionkowym, stosując mieszaninę chloroform — metanol — woda 60:26:5. Frakcje zawierające produkt główny zebrano, odparowano i rozcieńczono eterem etylowym. Otrzymano 4,35 g (76% wydajności teoretycznej) trójchlorowodoru tetradekapeptydu. Rf^7 0,37–0,47; Rf^9 0,55–0,60

Analiza: $\text{C}_{104}\text{H}_{182}\text{O}_{26}\text{N}_{23}\text{Cl}_3$ (2277,05)

Obliczono: N 14,2%, Cl 4,65%;

Otrzymano: N 14,5%, Cl 4,65%.

Analiza aminokwasów: ALA 0,95 (1), ARG 2,05 (2), ASP 1,0 (1), GLU 1,05 (1), GLI 1,0 (1), LIZ 2,85 (3), PRO 2,05 (2), TYR 1,0 (1), WAL 2,05 (2).

Etap 7: BOC — SER — TYR — SER — MET — GLU(O^tBu) — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(O^tBu) — GLI — ALA — GLU(O^tBu) — O^tBu^t (1–28).

0,986 g trójchlorowodoru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36, w przykładzie I, 1,138 g trójchlorowodoru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 6, 0,266 g pięcioklorofenolu i 0,206 g dwucykloheksylo karbodwuimidu rozpuszczono w 3,0 ml dwumetyloformamidu, zawierającego 50 mg trójetiloaminy. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 2 dni w temperaturze pokojowej, następnie rozcieńczono eterem etylowym nie zawierającym nadtlenu. Otrzymano osad rozdzielono chromatograficznie w kolumnie z żelem krzemionkowym stosując mieszaninę: octan — pirydyna — kwas mrówkowy — woda 60:20:6:5,5. Frakcje zawierające produkt główny w stanie czystym, zebrano razem i odparowano. Dalsze frakcje zawierające również produkt główny zebrano osobno, odparowano i ponownie rozdzielono chromatograficznie. W ten sposób otrzymano dodatkowe ilości czystego, chronionego oktaokapeptydu. Razem otrzymano 0,85 g (około 40% wydajności teoretycznej) chronionego oktaokapeptydu. Rf^7 0,17–0,25.

Etap 8: H — SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — LIZ — LIZ — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ — WAL — TYR — PRO — ASP — GLI — ALA — GLU — OH (1–28).

760 mg chronionego oktaokapeptydu, otrzymanego w etapie 7, rozpuszczonego w 20 ml 90% kwasu trójfluorooctowego, zawierającego 0,02% merkaptotetanolu. Roztwór pozostawiono na 15 minut, następnie odparowano. Pozostałość rozpuszczono w 3 ml wody i ponownie odparowano. Rozpuszczanie w wodzie i odparowywanie powtórzone jeszcze raz. Wreszcie produkt rozpuszczono w 5 ml wody i przeniesiono do kolumny zawierającej 20 ml żywicy jonowymiennej Amerlite IRA — 400 (w cyklu octanowym). Kolumnę przemyto sześciokrotnie, za każdym razem 5 ml wody i otrzymane roztwory wodne wysuszone przez liofilizację. Otrzymano 580 mg (około 90% wydajności teoretycznej) wolnego oktaokapeptydu. Rf^6 0,30–0,35.

Analiza aminokwasów: ASP 1,0 (1), SER 2,0 (2), GLU 2,03 (2), PRO 3,04 (3), GLI 3,1 (3), ALA 1,05 (1), WAL 3,09 (3), MET 0,97 (1), TYR 2,12 (2), FEN 1,0 (1), HIS 1,2 (1), LIZ 3,9 (4), ARG 2,91 (3).

Przykład XIII. Sposób otrzymywania fragmentu (1–28) ludzkiej kortykotropiny.

Etap 1: Z — ALA — GLI — GLU(O^tBu) Z.

11,9 g Z — GLI — OSu rozpuszczono w 170 ml octanu etylu, do roztworu oziębionego do temperatury 0°C dodano również oziębiony roztwór 12,2 g H — GLU(O^tBu) Z w 60 ml octanu etylu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na noc, następnie

wytrząsano z 1 normalnym roztworem kwasu solnego, z 5% roztworem wodorowęglanu sodu i w końcu z wodą. Roztwór w octanie etylu wysuszono i rozpuszczalnik odparowano. Otrzymano jako pozostałość Z — GLI — GLU(OBu^t) Z w postaci oleistej (Analiza: obliczono C 61,4%, H 7,6%, O 24,9%, otrzymano C 10,8%, H 7,6%, O 24,5%, który bez dalszego oczyszczania ponownie rozpuszczono w 200 ml octanu etylu po czym uwodorniono wobec palladu na węglu aktywnym aż do zakończenia wydzielania się CO₂. Otrzymany chromatograficznie (Rf¹ 0,7 ninhydrina) jednolity ester dwupeptydu H — GLI — GLU(OBu^t)₂ ekstrahowano 10% roztworem kwasu cytrynowego, następnie roztwór wodny zalkalizowano do pH = 9. Wydzielony olej ekstrahowano octanem etylu; roztwór w octanie etylu wysuszono po czym dodano w temperaturze 0°C roztwór 11,1 g Z — ALA — OSu w 150 ml octanu etylu. Mieszaninę pozostawiono w temperaturze pokojowej na okres 24 godzin po czym wytrząsano z 1 normalnym roztworem kwasu solnego, z 5% roztworem wodorowęglanu sodu i wreszcie z wodą, następnie suszono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

Otrzymano jako pozostałość, stałą pianę, którą rozcieńczono eterem etylowym i eterem naftowym i przesączano. Otrzymano 13,2 g (53,7% wydajności teoretycznej) surowego estru trópeptydu. Po przekrystalizowaniu z mieszaniny octanu etylu i eteru naftowego otrzymano 11,8 g oczyszczonego, krystalicznego produktu w postaci igieł. Temperatura topnienia 63—66°C.

Analiza: C₂₆H₃₉O₈N₃ (521,59).

Obliczono: C 59,9%, H 7,5%, N 8,0%.

Otrzymano: C 59,6%, H 7,7%, N 7,8%.

Etap 2: Z — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — GLU(OBu^t)₂ (25—28).

4,8 g chronionego estru trópeptydu Z — ALA — GLI — GLU(OBu^t)₂, otrzymanego w etapie 1 rozpuszczono w 60 ml 80% kwasu octowego i uwodorniono w zwykły sposób wobec palladu na węglu aktywnym. Po odsączeniu katalizatora i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano jako pozostałość oleisty, chromatograficzne (Rf¹ 0,5) jednolity produkt rozpuszczono w wodzie z chlorkiem sodu, roztwór doprowadzono do pH = 8 i wydzielony olej ekstrahowano octanem etylu. Roztwór w octanie etylu wysuszono po czym dodano w temperaturze 0°C 3,2 g Z — ASP(OBu^t) — OSu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na noc następnie przemyto w zwykły sposób, wysuszono, rozpuszczalnik oddestylowano i pozostałość pozostawiono do skrzepnięcia pod eterem naftowym. Otrzymano 4,75 g surowego, chronionego estru czteroptydu (74,6% wydajności teoretycznej). Produkt można przekrystalizować z mieszaniny o-ctanu etylu i eteru naftowego. Temperatura topnienia 88—90°C.

Analiza: C₃₄H₅₂O₁₁N₄ (692,78).

Obliczono: C 58,9%, H 7,5%, N 8,1%, O 25,4%.

Otrzymano: C 58,2%, H 7,2%, N 8,2%, O 25,6%.

Etap 3: Z — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — GLU(OBu^t)₂ (20—28).

2,5 g (3,6 milimola) chronionego estru czteroptydu, otrzymanego w etapie 2, rozpuszczono w 28 ml 80%-owego octanu etylu i uwodorniono wobec palladu na węglu aktywnym aż do zakończenia wydzielania się dwutlenku węgla. Katalizator odsączono, przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość rozpuszczono w 20 ml wody. Roztwór wodny zalkalizowano węglanem sodu do pH = 9 i wydzielony ester czteroptydu trzykrotnie wytrząsano, za każdym razem z 20 ml eteru etylowego. Zebrane roztwory eterowe wysuszono i odparowano. Otrzymano 1,8 g oleistego, surowego produktu (90% wydajności teoretycznej).

Produkt ten oraz 2,2 g (2,2 milimola) chronionego estru N-hydroksybursztynimidowego pięcioptydu, otrzymanego w etapie 1, w przykładzie II, rozpuszczono w 25 ml bezwodnego dioksanu, roztwór pozostawiono na okres 2 dni, następnie odparowano pod próżnią i pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu. Roztwór wytrząsano dwukrotnie za każdym razem z 10 ml 10% roztworu kwasu cytrynowego, następnie dwukrotnie z 10 ml 8% roztworu wodorowęglanu sodu, wytrącony przy wytrząsaniu osad odsączono. Roztwór wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu, octan etylu oddestylowano i pozostałość po dodaniu eteru naftowego przesączono. Otrzymano 3,15 g (100% wydajności teoretycznej) surowego, chronionego estru nonapeptydu. Temperatura topnienia 140° (temperatura mięknienia około 115°C). Po wytrąceniu z mieszaniny octanu etylu i eteru naftowego produkt topi się w temperaturze 132—146°C. Rf³ 0,72.

Analiza: C₇₃H₁₁₄N₁₀O₁₉ (1435,73).

Obliczono: C 60,0%, H 8,0%, N 9,8%.

Otrzymano: C 60,45%, H 8,24%, N 10,25%.

Etap 4: H — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — GLU(OBu^t)₂ (20—28).

3,1 g (2,35 milimola) chronionego estru nonapeptydu, otrzymanego w etapie 3, rozpuszczono w 60 ml 80% kwasu octowego i uwodorniono wobec palladu na węglu aktywnym. Po zakończeniu wydzielania się CO₂ katalizator odsączono i przesącz odparowano pod próżnią. Pozostałość rozpuszczono w 50 ml octanu etylu po czym przemyto czterokrotnie, za każdym razem 10 ml 8% roztworu wodorowęglanu sodu, następnie 10 ml 10% roztworu wodorowęglanu sodu, wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu i odparowano. Pozostałość skrzepła podczas stania pod eterem naftowym. Po przesączeniu i wysuszeniu otrzymano 1,7 g (61% wydajności teoretycznej) wolnego estru nonapeptydu. Temperatura topnienia 101—112°C (temperatura mięknienia około 93°C). Rf³ 0,15.

Etap 5: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO₂) — ARG(NO₂) — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — GLU(OBu^t)₂ (15—28).

1,6 g (1,23 milimola) wolnego estru nonapeptydu, otrzymanego w etapie 4, oraz 1,66 g (1,23 milimola) chronionego estru pięcioklorofenyłowego rozpusz-

czono w 2 ml dwumetyloformamidu. Roztwór pozostawiono na okres 1 dnia następnie rozcieńczono eterem etylowym, po czym osad odsączono, przemyto eterem i wysuszono. Otrzymano 2,65 g (90% wydajności teoretycznej) chronionego estru tetradekapeptydu.

Rf³ 0,55.

Etap 6: H — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — GLU(OBu^t)₂ · 3 HCl (15—28).

2,65 (1,21 milimola) chronionego estru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 5, rozpuszczono w 150 ml kwasu octowego i uwodorniono wobec palladu na węglu aktywnym. Postęp reakcji śledzono metodą chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji katalizator odsączono, przesącz odparowano, do pozostałości dodano eteru etylowego, przesączono i wysuszono. Otrzymany surowy produkt (2,35 g) rozpuszczono w 60 ml wody, roztwór oziębiono lodem i zakwaszono do pH = 4, dodając 7,8 ml 0,5 normalnego kwasu solnego. Trójchlorowodorek estru czteropeptydu wytrącono przez dodanie 10 ml nasyconego roztworu chlorku sodu, osad odsączono, przemyto nasyconym roztworem chlorku sodu i wysuszono. Produkt (1,45 g) zawierający chlorek sodu rozpuszczono w 20 ml etanolu, po czym dodano 20 ml chloroformu a wytrącony chlorek sodu odsączono. Po odparowaniu otrzymano 1,35 g (53% wydajności teoretycznej) wolnego estru tetradekapeptydu. Rf¹ 0,35.

Etap 7: BOC — SER — TYR — SER — MET — GLU(OBu^t) — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ(BOC) — PRO — WAL — GLI — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(OBu^t) — PRO — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — GLU(OBu^t)₂ · 3 HCOOH. (1—28).

0,60 g (0,305 milimola) chronionego tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, 0,69 g (0,305 milimola) trójchlorowodoru estru tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 6, oraz 0,48 g (1,8 milimola) pięciochlorofenolu rozpuszczono w 2,0 ml dwumetyloformamidu, do roztworu dodano 0,124 g (0,6 milimola) dwucykloheksylo — karbodwuimidu i pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę reakcyjną zobojętniono roztworem 0,3 ml (0,215 milimola) trójetyleaminy w 1,5 ml dwumetyloformamidu, pozostawiono na 1 dzień, po czym rozcieńczono eterem etylowym, nie zawierającym nadtlenu. Wytrącony produkt odsączono, przemyto eterem etylowym i wysuszono. Otrzymany surowy produkt 1,45 g rozdzielono chromatograficznie w kolumnie o średnicy 2 cm, zawierającej 50 g żelu krzemionkowego, stosując mieszaninę octanu etylu — pirydyna — kwas mrówkowy — woda 60:20:6:5,5. W ciągu każdych 20 minut zbierano 3 ml frakcji. Czysty, chroniony oktakozepeptyd uzyskano z frakcji 79 do 100 przez odparowanie. Otrzyma-

no 0,171 g (13% wydajności teoretycznej) czystego produktu. Rf⁷ 0,30.

Etap 8: H — SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — LIZ — LIZ — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ — TYR — PRO — ASP — ALA — GLI — GLU — OH (1—28).

171 mg chronionego oktapeptydu, otrzymanego w etapie 7, rozpuszczono w 5 ml 90% kwasu trójfluorowego, roztwór pozostawiono na 15 minut po czym odparowano. Pozostałość rozpuszczono w 2 ml wody i ponownie odparowano; operację tę powtórzono, następnie pozostałość rozpuszczono w 2 ml wody i przepuszczono przez kolumnę zawierającą 5 ml żywicy jonowymiennej Amberlite IRA-400 w cyklu octanowym. Kolumnę przemyto następnie 120 ml wody i połączone cieczy poddano liofilizacji. Otrzymano 127,5 mg (96% wydajności teoretycznej) wolnego oktakozepeptydu.

Analiza aminokwasów: LIZ 3,86 (4), ARG 2,95 (3), HIS 1,2 (1), ASP 1,01 (1), SER 2,05 (2), GLU 2,05 (2), PRO 2,9 (3), GLI 3,0 (3), ALA 0,97 (1), WAL 2,85 (3), MET 0,96 (1), TYR 1,77 (2), FEN 1,04 (1).

Przykład XIV. Sposób otrzymywania fragmentu (1—32) ludzkiej kortykotropiny.

Etap 1: Z — SER — ALA — OBU^t (31—32)

Z 7,5 g (29,5 milimola) Z — SER — N₂H₃ sporządzono zawiesinę w 80 ml dwumetyloformamidu, zawiesinę oziębiono do temperatury —10°C po czym dodano najpierw 7,3 ml stężonego kwasu solnego, następnie wkroplono stężony, wodny roztwór 2,04 g azotanu sodu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w ciągu 5 minut, następnie ostrożnie zalkalizowano 12,4 ml trójetyleaminy, po czym do roztworu azydu dodano roztwór 4,5 g (41 milimola) ALA — OBU^t w 16 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę mieszano w ciągu godziny, utrzymując temperaturę —10°C, po czym pozostawiono do następnego dnia w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i oleistą pozostałość rozpuszczono w mieszaninie 150 ml octanu etylu i 30 ml wody. Roztwór wytrząsano trzykrotnie za każdym razem z 30 ml 10% roztworem kwasu cytrynowego, następnie trzykrotnie, za każdym razem z 30 ml, 8% roztworu wodorowęglanu sodu i w końcu z 30 ml wody. Warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu i odparowano. Oleisty ester dwupeptydu pozostawiono do skrzepnięcia pod eterem naftowym, następnie odsączono. Otrzymano 8,4 g (76% wydajności teoretycznej) chronionego estru dwupeptydu; po przekrystalizowaniu z 10% etanolu temperatura topnienia wynosiła 63—65°C. Analiza: C₁₈H₂₆N₂O₆ + 1/3 H₂O (372,42) Obliczono: C 58,10%, H 7,25%, N 7,53%. Otrzymano: C 58,18%, H 7,26%, N 7,80%.

Etap 2: H — SER — ALA — OBU^t. HOOC — CH₃ (31—32).

10,0 g (27,4 milimola) Z — SER — ALA — OBU^t rozpuszczono w 100 ml 80% kwasu octowego i uwodorniano wobec palladu na węglu aktywnym.

nym. Po zakończeniu wydzielania się CO_2 katalizator odsączono, a roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość pozostawiono do skrzepnięcia pod eterem etylowym, po czym przesączono. Otrzymano 6,9 g (87% wydajności teoretycznej) wolnego octanu estru dwupeptydu. Temperatura topnienia $76-78^\circ\text{C}$. R_f 0,55.

Etap 3: Z — GLU(NH_2) — OPCP (30).

14,0 g (50 milimoli) Z — GLU(NH_2), 13,3 g (50 milimoli) pięcioklorofenolu oraz 10,5 g (50 milimoli) dwucykloheksylokarbodiimidu rozpuszczono w 150 ml dwumetyloformamidu w temperaturze 0°C . Mieszaninę reakcyjną utrzymywano w temperaturze 0°C w ciągu 1 godziny, następnie pozostawiono do ogrzania się do temperatury pokojowej. Następnego dnia odsączono dwucykloheksylo-mocznik, a roztwór odparowano pod próżnią. Otrzymano krystaliczną pozostałość, którą rozcieńczono eterem i przesączono. Otrzymano 17,25 g (65% wydajności teoretycznej) aktywnego estru. Temperatura topnienia $179-181^\circ\text{C}$.

Etap 4: Z — GLU(NH_2) — SER — ALA OBut (30—32).

4,2 g (14,4 milimola) soli estru dwupeptydu SER — ALA — OBut — octan oraz 7,6 g (14,4 milimola) Z — GLU(NH_2) — OPCP rozpuszczono w mieszaninie 5 ml bezwodnej pirydyny i 30 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 20 godzin, następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymałą oleistą pozostałość rozcieńczono eterem etylowym, przemyto 8% roztworem wodorowęglanu sodu, następnie wodą i wysuszono. Otrzymano 4,8 g (67,5% wydajności teoretycznej) chronionego estru trójpeptydu. Temperatura topnienia $183-185^\circ\text{C}$. Po przekrystalizowaniu z wody, czysty ester topi się w temperaturze $196-197^\circ\text{C}$. Temperatura mięknienia około 193°C .

Analiza: $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_8$ (494,63)

Obliczono: N 11,35%;

Otrzymano: N 11,33%.

Etap 5: Z — ASP(OBut) — GLU(NH_2) — SER — ALA OBut (29—32).

4,1 g (8,3 milimola) chronionego estru trójpeptydu Z — GLU(NH_2) — SER — ALA — OBut rozpuszczono w 400 ml metanolu podczas ogrzewania, następnie do roztworu, oziębionego do temperatury pokojowej, dodano metanолоwый roztwór 300 mg (8,3 milimola) chlorowodoru i uwodorniano wobec palladu na węglu aktywnym, aż do zakończenia wydzielania się CO_2 . Następnie katalizator odsączono, a roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymałą pozostałość w postaci stałej piany rozpuszczono w 32 ml dwumetyloformamidu, po czym dodano 3,45 g (8,2 milimola) aktywnego estru Z — ASP(OBut) — ONSu oraz 1,16 ml (8,3 milimola) trójetyloaminy. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na okres 2 dni, następnie odparowano, a oleistą pozostałość pozostawiono do skrzepnięcia pod eterem etylowym. Odsączony produkt przemyto eterem etylowym, 8% roztworem wodorowęglanu sodu i w końcu wodą, po czym wysu-

szone. Otrzymano 4,8 g (87,5% wydajności teoretycznej) chronionego estru cztero-peptydu. Temperatura topnienia $181-183^\circ\text{C}$.

Analiza: $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_4$ (665,75)

Obliczono: C 55,9%, H 7,10%, N 10,60%

Otrzymano: C 55,9%, H 7,20%, N 10,60%.

Etap 6: Z — GLU(OBut) — ASP(OBut) — GLU(NH_2) — SER — ALA — OBut (28—32).

6,0 g (9,0 milimola) chronionego estru cztero-peptydu, otrzymanego w etapie 5, rozpuszczono w 100 ml 80% kwasu octowego i uwodorniono wobec palladu na węglu aktywnym aż do zakończenia wydzielania się CO_2 . Następnie katalizator odsączono, rozpuszczalnik odparowano, a do otrzymanego jako pozostałość oleistego estru tetrapeptydu dodano 20 ml etanolu, alkohol oddestylowano, operację tę powtórzono jeszcze raz. Następnie pozostałość rozpuszczono w 20 ml dwumetyloformamidu i dodano 5,3 g (9,0 milimola) chronionego, aktywnego estru Z — GLU(OBut) — OPCP. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej, następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozcieńczono eterem etylowym, odsączono i przemyto na filtrze eterem etylowym, po tym 8% roztworem wodorowęglanu sodu, w końcu wodą i wysuszono. Otrzymano 6,6 g (86% wydajności teoretycznej) chronionego estru pięciopeptydu. Temperatura topnienia $170-173^\circ\text{C}$. R_f 0,65.

Analiza: $\text{C}_{40}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_{14}$ (850,97)

Obliczono: C 56,4%, H 7,35%, N 9,90%;

Otrzymano: C 55,8%, H 7,45%, N 9,75%.

Etap 7: Z — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR (But) — PRO — ASP(OBut) — ALA — GLI — GLU(OBut) — ASP(OBut) — GLU(NH_2) — SER — ALA — OBut (20—32).

1,2 g (1,4 milimola) chronionego estru pięcio-peptydu, otrzymanego w etapie 6, rozpuszczono w 50 ml etanolu i uwodorniono wobec palladu na węglu aktywnym w zwykły sposób. Po odsączeniu katalizatora i odparowaniu roztworu pozostałość oraz 1,6 g (1,4 milimola) estru N-hydroksybur-sztynoimidowego, który otrzymano z chronionego oktapeptydu, otrzymanego w etapie 2 w przykładzie II, rozpuszczono w 10 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na noc, następnie odparowano, pozostałość rozcieńczono wodą, przesączono i przemyto na filtrze 8% roztworem wodorowęglanu sodu, po czym wodą. Otrzymano 2,25 g (85% wydajności teoretycznej) surowego chronionego estru tetradekapeptydu. R_f 0,55; Produkt wykazywał podczas chromatografii domieszkę oczyszczonego, chronionego oktapeptydu (R_f 0,15).

Etap 8: Z — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG(NO_2) — ARG(NO_2) — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(But) — PRO — ASP(OBut) — ALA — GLI — GLU(OBut) — ASP(OBut) — GLU(NH_2) — SER — ALA — OBut (15—32).

2,25 g (1,19 milimola) chronionego estru tridekapeptydu, otrzymanego w etapie 7, rozpuszczono w

50 ml etanolu i uwodorniono wobec palladu na węglu aktywnym. Katalizator odsączono i roztwór odparowano. Otrzymany jako pozostałość wolny ester tridekapeptydu oraz 1,44 g (1,06 milimola) estru pentachlorofenyloвого pentapeptydu, otrzymanego w etapie 17b w przykładzie I, rozpuszczono w 5 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę pozostawiono na 1 dzień, następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość pozostawiono dla skrzepnięcia pod bezwodnym eterem etylowym. Produkt przemyto eterem i wysuszono. Otrzymano 2,75 g (91% wydajności teoretycznej) surowego produktu, który rozpuszczono w 10 ml octanu etylu, po czym przeniesiono do kolumny o średnicy 2 cm, zawierającej 60 g żelu krzemionkowego i eluowano mieszaniną: octan etylu — pirydyna — kwas octowy — woda 120:10:3:5,5. W ciągu każdych 20 minut zebrano frakcje o objętości 3 ml. Po odparowaniu połączonych frakcji 129—241 otrzymano 0,3 g chronionego oktapeptydu. R_f^3 0,35.

Etap 9: H — LIZ(BOC) — LIZ(BOC) — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ(BOC) — WAL — TYR(Bu^t) — PRO — ASP(OBu^t) — ALA — GLI — GLU(OBu^t) — GLU(NH₂) — SER — ALA — OBut · 3 HCl (15—32).

300 mg chronionego estru oktapeptydu, otrzymanego w etapie 8, rozpuszczono w 20 ml 80% kwasu octowego i uwodorniono wobec palladu na węglu aktywnym. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji roztwór przesączono, odparowano pod próżnią, pozostałość rozcieńczono bezwodnym eterem etylowym, przesączono i wysuszono. Otrzymany octan oktapeptydu rozpuszczono w 7 ml 0,2 normalnego roztworu kwasu solnego w temperaturze 0°C, po czym produkt wytrącono przez dodanie 7 ml nasyconego roztworu chlorku sodu. Po przesączeniu i przemyciu nasyconym roztworem chlorku sodu, produkt wysuszono. Otrzymano 144 mg (50% wydajności teoretycznej) trójklorowodoru oktapeptydu. R_f^1 0,40.

Etap 10: BOC — SER — TYR — SER — MET — GLU(OBu^t) — HIS — FEN — ARG — TRY — 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) — ASP(OBu^t) — GLU(NH₂) — SER — ALA — OBut · 3 HCLOOH (1—32).

120 mg (0,060 milimola) chronionego tetradekapeptydu, otrzymanego w etapie 36 w przykładzie I, 144 mg (0,053 milimola) trójklorowodoru estru oktapeptydu, otrzymanego w etapie 9, oraz 97 mg (0,36 milimola) i 25 mg (0,12 milimola) dwucykloheksylo karbodwuimidu rozpuszczono w 0,4 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę pozostawiono na dzień następnie dodano roztwór 0,06 ml (0,43 milimola) trójetyleaminy w 0,4 ml dwumetyloformamidu i znów pozostawiono na 1 dzień. Następnie wytrącono z mieszaniny osad przez dodanie eteru etylowego, nie zawierającego nadtlenu.

Osad przesączono, przemyto eterem i wysuszono. Otrzymany surowy produkt (270 mg) rozdzielono chromatograficznie w kolumnie zawierającej 8 g żelu krzemionkowego, stosując mieszaninę: octan — pirydyna — kwas mrówkowy — woda 60:20:6:5,5. W ciągu każdych 20 minut zbierano 0,5 ml frakcji. Produkt główny uzyskano przez odparowanie frakcji 109 do 135. W ten sposób otrzymano 24 mg (10% wydajności teoretycznej) chronionego dotriakontapeptydu. R_f^7 0,2.

Etap 11: H — SER — TYR — SER — MET — GLU — HIS — FEN — ARG — TRY — GLI — LIZ — PRO — WAL — GLI — LIZ — LIZ — ARG — ARG — PRO — WAL — LIZ — WAL — TYR — PRO — ASP — ALA — GLI — GLU — ASP — GLU(NH₂) — SER — ALA — OH (1—32).

17 mg chronionego dotriakontapeptydu, otrzymanego w etapie 10 rozpuszczono w 0,5 ml 90% kwasu trójklorooctowego a po 15 minutach stania rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 0,5 ml wody i odparowano, operację tę powtórzono. Wreszcie pozostałość rozpuszczono w 0,5 ml wody, po czym wprowadzono do kolumny zawierającej 8 ml żywicy jonowymiennej Amberlite IRA-400 w cyklu octanowym. Kolumnę przemyto 10 ml wody, a połączone roztwory wodne poddano liofilizacji. Otrzymano 11 mg (80% wydajności teoretycznej) wolnego dotriakontapeptydu. R_f^8 0,45.

Analiza aminokwasów: LIZ 4,16 (4), ARG 2,98 (3), HIS 1,5 (1), ASP 2,0 (2), SER 3,4 (3), GLU 3,5 (3), PRO 3,2 (3), GLI 3,5 (3), ALA 1,6 (2), WAL 3,2 (3), MET 1,1 (1), TYR 2,1 (2), FEN 1,3 (1).

Zastrzeżenia patentowe

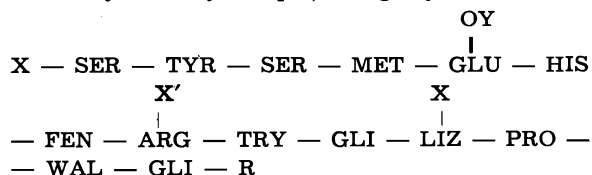
1. Sposób wytwarzania kortykotropowych polipeptydów o ogólnym wzorze 1:

H	SER	TYR	SER	MET	GLU	
	1	2	3	4	5	
HIS	FEN	ARG	TRY	GLI	LIZ	
6	7	8	9	10	11	
PRO	WAL	GLI	LIZ	LIZ	ARG	
12	13	14	15	16	17	
ARG	PRO	WAL	LIZ	WAL	TYR	
18	19	20	21	22	23	
PRO	W	ALA	FEN	PRO	LEU	
24	34	35	36	37		
GLU	FEN	OH				
38	39					

w którym W oznacza jedną z następujących sekwencji aminokwasów:

— ASP	— GLI	— ALA	— GLU	— ASP	— GLN
25	26	27	28	29	30
— LEU	— ALA	— GLU	— lub	— ASP	— GLI
31	32	33		25	26
— GLU	— ALA	— GLU	— ASP	— SER	— ALA
27	28	29	30	31	32
— GLN	— lub	— ALA	— GLI	— GLU	— ASP
33		25	26	27	28
— ASP	— GLU	— ALA	— SER	— GLN	—
29	30	31	32	33	

albo fragmentów tych polipeptydów, zawierających co najmniej 15 pierwszych wymienionych aminokwasów, **znamienny tym**, że chroniony tetradeka-peptyd zbudowany z pierwszych 14 aminokwasów naturalnych kortykotropin, o ogólnym wzorze 3:



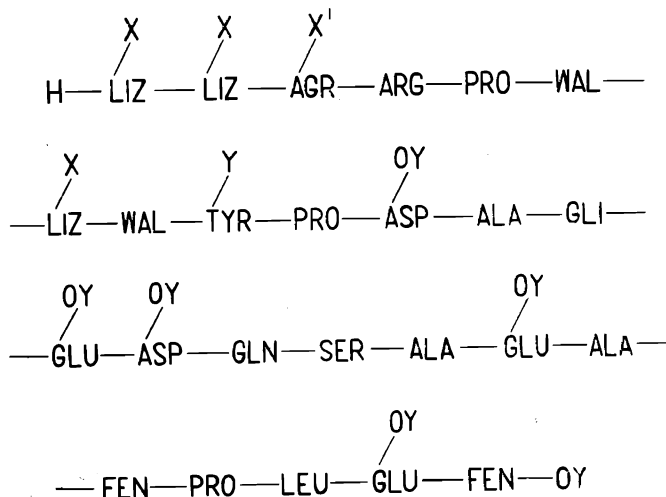
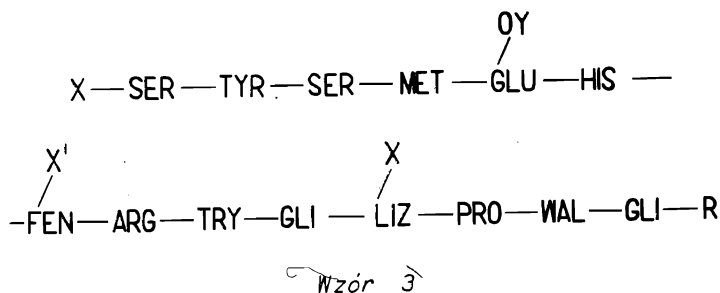
w którym X i Y oznaczają znane grupy ochronne dające się usuwać, X' oznacza dającą się usuwać grupę ochronną, odpowiednią do ochrony grupy guanidynowej, albo atom wodoru, a R oznacza grupę wodorotlenową lub znany podstawnik aktywujący grupę karboksylową, sprzęga się za pomocą metod znanych w chemii peptydów z chronionym peptydem, zawierającym sekwencje stanowiące resztężądanego produktu polipeptydowego, po czym z otrzymanego polipeptydu usuwa się znanym sposobem grupy ochronne.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że chroniony tetradeka-peptyd o wzorze 3, w którym X, Y i X' mają znaczenie podane w zastrz. 1, a R oznacza grupę wodorotlenową, poddaje się reakcji z chronionym peptydem w obecności karbodwuimidu, a jeżeli R we wzorze 3 oznacza grupę acyloksylową, wówczas reakcję tę prowadzi się w obecności zdolnego do reakcji estru albo mieszanego bezwodnika.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się zdolny do reakcji ester o wzorze 3, w którym X, Y i X' mają znaczenie podane w zastrzeżeniu 1, a R oznacza grupę p-nitrofenoksyłową lub pięciochlorofenoksyłową.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces sprzęgania się w obecności karbodwuimidu i związku hydroksylowego.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w obecności dwucykloheksylokarbodwuimidu i pięciochlorofenolu.

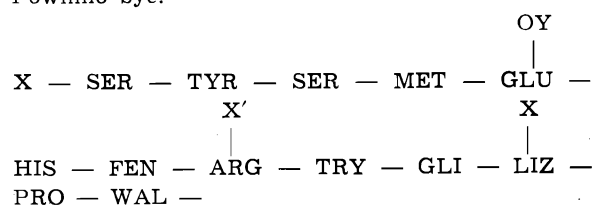


Errata

Opis 79252

łam 3, wiersz 33—36

Powinno być:



łam 8, wiersz 18

jest: hydrozydu

powinno być: hydrazydu

łam 14, wiersz 50

jest: krzemiankowego

powinno być: krzemionkowego

łam 17, wiersz 2

jest: eteropeptydu

powinno być: czteropeptydu

łam 20, wiersz 19

jest: chloroformu butanolu

powinno być: chloroformu i butanolu

łam 28, wiersz 41

jest: etyloamidy

powinno być: etyloaminy

łam 32, wiersz 43

jest: 548,8 mg

powinno być: 584,8 mg

łam 41, wiersz 14

jest: 2,65 (1,21 milimola)

powinno być: 2,65 g (1,21 milimola)

łam 42, wiersz 35

jest: azotanu sodu

powinno być: azotynu sodu