

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

90 224

Patent dodatkowy
do patentu —————

MKP C07c 103/52

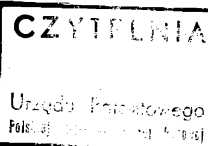
Zgłoszono: 01.06.70 (P. 141025)

Pierwszeństwo: 03.06.69 dla zastrz. 2;
20.06.69 dla zastrz. 3–5;
26.06.69 dla zastrz. 6
Szwajcaria

Int. Cl². C07C 103/52

Zgłoszenie ogłoszono: 15.05.73

Opis patentowy opublikowano: 30.11.1977



Twórca wynalazku: —————

Uprawniony z patentu: Sandoz AG, Bazylea (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania nowych polipeptydów

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych polipeptydów lub pochodnych polipeptydów o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku, w którym X oznacza atom wodoru, grupę aminową, grupę $R-CO-NH-$, w której R oznacza alkil, ewentualnie podstawiony aralkil lub ewentualnie podstawiony aryl lub grupę $R'OC-CO-NH-$, w której R' oznacza alkil, alkenyl, ewentualnie podstawiony aralkil lub ewentualnie podstawiony aryl, przy czym reszta R' nie daje się odszczepiać za pomocą kwasu trójfluorooctowego, a Y oznacza amid L-proliny lub amid L-proliny-L-waliny, oraz w którym reszta L-serylowa może być wymieniona na resztę L-treonylową lub L-alanylową, reszta L-asparaginylowa może być wymieniona na resztę L-aspartylową, L-glutaminylową lub L-glutamylową, reszta L-treonylowa może być wymieniona na resztę L-serylową lub L-alanylową, reszta L-lizylowa może być wymieniona na resztę BOC-lizylową, L-ornitylową lub L-arginylową, reszta L-glutaminylowa może być wymieniona na resztę L-glutamylową, L-asparaginylową lub L-aspartylową, reszta L-glutamylowa może być wymieniona na resztę OTB-glutamylową, L-glutaminylową, L-asparaginylową lub L-aspartylową, reszta L-leucylowa może być wymieniona na resztę L-tyrozylową, reszta L-tyrozylowa może być wymieniona na resztę L-feniloalanylową oraz reszta L-arginylowa może być wymieniona na resztę L-ornitylową lub L-lizylową, jak również terapeutycznie aktywnych soli addycyjnych z kwasami i kompleksów z metalami ciężkimi wymienionych związków.

W przypadku gdy X oznacza grupę $-NH_2$, $R-CO-NH-$ lub $R'-O-CO-NH-$, to aminokwas $HS-CH_2-CHX-COOH$ występuje w postaci L.

Podstawnik R może np. oznaczać grupę metylową, etylową, propylową, III-rzęd.butylową lub ewentualnie podstawioną atomem chlorowca, niższą grupą alkoksylową lub grupą nitrową grupę fenylową lub benzylową.

Podstawnik R' może np. oznaczać grupę propylową, alilową, benzylową, p-nitrobenzylową, p-chlorobenzylową, p-bromobenzylową grupę p-azobenzylową lub p-metoksyzobenzylową.

W sekwensach polipeptydowych o wyżej podanym wzorze ogólnym pojedyncze aminokwasy mogą być wymienione przez inne naturalne aminokwasy lub ich pochodne.

Tak więc np. w pozycji 2, 5, 13 i 29 Ser może być zastąpiony przez Thr lub Ala, w pozycji 3 i 26 Asn przez Asp, Gln lub Glu, w pozycji 6, 21, 25, 27 i 31 Thr przez Ser lub Ala, w pozycji 11 i 18 Lys przez BOC-Lys, Orn

lub Arg, w pozycji 14 i 20 Gln przez Glu, Asn lub Asp, w pozycji 15 Glu przez OTB—Glu, Gln, Asn lub Asp, w pozycji 19 Leu przez Tyr, w pozycji 22 tyr przez Phe i w pozycji Arg przez Orn lub Lys.

Według wynalazku polipeptydy lub pochodne polipeptydów o wyżej podanym wzorze ogólnym wytwarza się w ten sposób, że wymienione w powyższym wzorze aminokwasy względnie ich pochodne kondensuje się w kolejności podanej w tym wzorze pojedynczo lub po utworzeniu mniejszych jednostek peptydowych, przy czym aminokwas lub peptyd o chronionej grupie α -aminowej i aktywowanej końcowej grupie karboksylowej poddaje się reakcji z aminokwasem lub peptydem o wolnej grupie α -aminowej i wolnej lub chronionej końcowej grupie karboksylowej, a aminokwas lub peptyd o aktywowanej grupie α -aminowej i chronionej końcowej grupie karboksylowej poddaje się reakcji z aminokwasem lub peptydem o wolnej końcowej grupie karboksylowej i chronionej grupie α -aminowej, przy czym wolne grupy funkcyjne nie biorące udziału w reakcji równocześnie chroni się, po zakończeniu kondensacji odszczepia zbędne grupy ochronne, przy czym w wolnym momencie syntezy grupę karboksylową występującą w położeniu końcowym reszty Pro względnie Pro-Val przeprowadza się po jej zaktywowaniu w grupę amidową drogą reakcji z amoniakiem, grupę merkaptu po utworzeniu sekwencji częściowej 1—7 utlenia się, w przypadku, gdy w położeniu 1 występuje grupa merkaptu-propionylowa, przed utlenianiem grup merkaptu występującą w położeniu 2 grupę L-Ser albo części składowe peptydu zawierające tę grupę L-Ser kondensuje się z ewentualnie aktywowaną pochodną kwasu propionowego i tak otrzymane produkty końcowe przeprowadza się w znany sposób za pomocą organicznych lub nieorganicznych kwasów w terapeutycznie czynne sole addycyjne z kwasami albo w kompleksy z metalami ciężkimi.

Grupę karboksylową można np. zaktywować przez przeprowadzenie w azydek, bezwodnik, imidazolid, izoksazolid kwasowy lub w aktywny ester albo przez reakcję z karbodwuimidem lub N,N'-karbonyldwuimidazolem. Korzystnie jako metodę kondensacji stosuje się metodę karbodwuimidową, azydową, metodę aktywowania estrów, metodę bezwodnikową lub metodę Merrifielda.

Wprowadzenie ewentualnej pożądanej w produkcie końcowym grupy ochronnej do końcowej cząsteczki L-hemicystyny może nastąpić w dowolnym etapie przed ostatnim etapem.

W ostatnim etapie kondensacji należy jednak zastosować metody, przy których racemizowanie występuje, lub może być utrzymana na nieznacznym poziomie, korzystnie przez stosowanie azydków lub aktywowanych estrów, przy czym aktywacja może być dokonana korzystnie za pomocą N-hydroksysukcynimidu.

Nie biorące udziału w reakcji wolne, funkcyjne grupy mogą być chronione przy syntezie peptydów sposobem według wynalazku w następujący sposób. Dla zablokowania grupy guanidowej reszty argininowej w poniżej opisanym sekwensie składowym B zastosowano grupę nitrową, ale można również stosować inne nadające się grupy ochronne, takie jak grupa tozylowa, grupa p-nitrokarbobenzoksylowa lub grupa 2-(izopropylometyloksykarbonylo)-3,4,5,6-czterochlorobenzoilowa. Można również zastosować w syntezie efekt ochronny protonacji grupy guanidowej.

W syntezie polipeptydów lub pochodnych polipeptydowych dla blokowania grupy γ -karboksylowej, np. w poniżej opisanym sekwensie składowym D, korzystną okazała się grupa III-rzęd.-butoksylowa, jednakże mogą być również zastosowane inne grupy ochronne, takie jak grupa metoksylowa, etoksylowa, III-rzęd. amyloksylowa, amidowa lub benzyloksylowa.

Dla zablokowania grupy ω -aminowej reszty lizyny, np. w poniżej opisanym sekwensie składowym C, można stosować grupę karbo-III-rzęd.-alkoksylową, korzystnie karbo-III-rzęd.-butoksylową.

Jako grupy ochronne dla grup merkaptu w poniżej opisanym sekwensie składowym EF i EF3 stosuje się korzystnie grupę benzyłową, lub trytyłową. Grupy benzyłowe lub trytyłowe zastosowane do ochrony grup SH zwykle odszczepia się na końcu syntezy działaniem sodu w ciekłym amoniaku. Stwierdzono, że odszczepianie grupy ochronnej benzyłowej względnie trytyłowej, jak również wytwarzanie wiązania S—S przed ostatnim etapem prowadzi do szczególnie dobrych wydajności produktu końcowego.

Przeprowadzenie chronionej grupy merkaptu lub aminowej w wolną grupę, jak również przekształcenie funkcyjnie przekształconej grupy karboksylowej w wolną grupę karboksylową w trakcie wytwarzania polipeptydów następuje według ogólnie znanych metod działaniem środków hydrolizujących względnie redukujących.

Wyjściowe produkty do wytwarzania polipeptydów względnie pochodnych polipeptydów o ile dotąd nie były znane, mogą być otrzymane według metod znanych w chemii peptydów, przy czym aminokwasy łączy się ze sobą pojedynczo lub po uprzednim wytworzeniu mniejszych jednostek peptydowych.

Polipeptydy lub pochodne polipeptydów można uzyskiwać względnie stosować również w postaci ich soli. Jako sole wchodzi w rachubę sole z organicznymi kwasami, takimi jak np. kwas octowy, mlekowy, bursztynowy, benzoesowy, salicylowy, metanosulfonowy, toluenosulfonowy, jak również polimerycznymi kwasami, takimi jak kwas garbnikowy lub karboksymetyloceluloza, oraz sole z nieorganicznymi kwasami, takimi jak kwasy chlorowodorowe, np. kwas solny, lub kwas siarkowy i fosforowy. Jako kompleks metalu ciężkiego wchodzi np. w rachubę kompleks cynku (Zn^{++}).

Sposobem według wynalazku korzystnie postępuje się tak, że od

III-rzęd.butyloksykarbonylo-L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucyloglicylo-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-γ-butoksy-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-seryloglicylo-L-treonylo-L-prolinamidu

odszczępia się grupy ochronne otrzymując

L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamid,

od III-rzęd.butyloksykarbonylo-L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamidu

odszczępia się grupy ochronne otrzymując

L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinoamid,

od III-rzęd.butyloksykarbonylo-L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-γ-III-rzęd.butoksy-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-tyrozylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamidu

odszczępia się grupy ochronne, otrzymując

L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-L-lizylo-L-tyrozylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamid, od III-rzęd.butyloksykarbonylo-L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucyloglicylo-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-tyrozylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamidu

odszczępia się grupy ochronne, otrzymując

L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-L-lizylo-L-tyrozylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamid,

od β-merkaptopropionylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-cysteinylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-N-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-γ-III-rzęd.butoksy-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-N-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamidu

odszczępia się grupy ochronne, otrzymując

β-merkaptopropionylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamid.

Związki wytworzone sposobem według wynalazku mają istotne terapeutyczne znaczenie. Obniżają one poziom wapnia w surowicy krwi i jako związki antagonistyczne hormonu paratowego powodują pozytywny bilans wapnia w kościach. Biologiczne działanie nowych związków zbadano na szczurach, przy czym w wyniku obniżenia poziomu wapnia we krwi uzyskano wartość 3 000–5 000 jednostek MRC na mg peptydu.

Stosowana dawka zależy od pożądanego działania, jak również od sposobu zastosowania. W ogólności uzyskuje się jednak zadowalające wyniki za pomocą jednej dawki dziennej wynoszącej 1–10 jednostek na kologram wagi ciała zwierzęcia. Dla większych ssaków dawka dzienna wynosi około 70–700 jednostek, które

można podawać w jednej lub kilku porcjach. Do stosowania domięśniowego odpowiednia postać zawiera około 70–700 jednostek substancji aktywnej zmieszanej z ciekłym nośnikiem.

Związki wytworzone sposobem według wynalazku są więc dzięki temu wskazane we wszystkich stanach, przy których pożądane jest obniżenie poziomu wapnia w surowicy krwi względnie wpływanie na przemianę materii kostnej, np. w hyperkalcemiach wskutek braku endogennej tyreokaloitoniny w wyniku niedoczynności tkanki gruczołu tarczycowego lub nadczynności gruczołów przytarczycznych. Ponadto są one wskazane przy wszystkich schodzeniach kości, polegających na wzmożonej odbudowie lub przy których pożądane jest utrwalenie wapnia w kościach, np. przy osteoporozie różnego pochodzenia (np. postklimakterycznej, postraumatycznej wywołanej przez terapię kortikosteroidową lub brak aktywności itd. (złamaniach, rozmiękczeniach kości, krzywicy i dystrofii kostnej na podłożu nerkowym, jak również w szczególności dla terapii kombinacyjnej za pomocą wapnia względnie fosforanów.

Korzystną stroną polipeptydów względnie pochodnych polipeptydowych otrzymanych sposobem według wynalazku o wzorze ogólnym podanym na rysunku, w którym X oznacza grupę $R-CO-NH$, w której R oznacza alkil, ewentualnie podstawiony aralkil lub ewentualnie podstawiony aryl lub grupę $R'-O-CO-NH-$, w której R oznacza alkil, alkenyl, ewentualnie podstawiony aralkil lub ewentualnie podstawiony aryl, jest ich trwałość względem odbudowującego działania aminopeptydaz.

Związki wytworzone sposobem według wynalazku mogą znaleźć zastosowanie jako środki lecznicze, np. w postaci farmaceutycznych preparatów. Preparaty te zawierają wymienione związki w mieszaninie z organicznym lub nieorganicznym nośnikiem nadającym się do stosowania pozajelitowego. Mogą być one również podawane w postaci preparatów o przedłużonym działaniu.

W opisie stosuje się następujące skróty:

Z = karbobenzoksy (benzyloksykarbonyl)

Bzl = benzyl

BOC = III-rzęd.butyloksykarbonyl

TrT = trytyl = trójfenyloetyl

OTB = III-rzęd.butyloksy

ONP = ester p-nitrofenylowy

OCP = 2,4,5-trójklorofenoksy

OME = metoksy

OEt = etoksy

NO_2 = nitro

Ser = L-seryl

Asn = L-asparaginył

Leu = L-leucyl

Thr = L-treonyl

Val = L-walil

Tyr = L-tyrozyl

Arg = L-arginyl

Gln = L-glutaminyl

Glu = L-glutamyl

His = L-histydyl

Pro = L-prolil

Gly = glicyl

Cys = L-cysteinył

Piv = piwaloil

MCP = β -merkaptopropionyl

OSu = N-oksusukcynimid

EOC = etoksykarbonyl

DCHA = dwucykloheksyloamina

W następujących przykładach, wszystkie temperatury podane są w stopniach Celsjusza. Wartość c przy skręcalności optycznej wynosi 1. Analiza aminokwasów w następujących przykładach wykazuje, że pojedyncze aminokwasy występują w oczekiwanych stosunkach.

P r z y k ł a d 1. Sekwens składowy A: $H-Ser-Gly-Thr-Pro-NH_2$.

a) $H-Thr-Pro-NH_2 \cdot HCl$.

Rozpuszcza się w temperaturze -5° 134 g $Z-Thr-NH-NH_2$ w 2 litrach 1 n kwasu solnego i zadaje 0,55 litra 1n azotynu sodowego. Po upływie 5 minut dodaje się węglanu potasowego do wartości pH = 9, otrzymany

azydek ekstrahuje się za pomocą octanu etylu i dodaje się roztwór 80 g $\text{H-Thr-Pro-NH}_2 \cdot \text{HCl}$ w 100 ml wody, 500 ml dwumetyloformamidu i 77 ml trójetiloaminy. Odparowuje się octan etylu w temperaturze 20° pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostawia na noc w temperaturze 25° . Pozostały roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu, roztwór przemycia się wodą, rozcieńczonym kwasem solnym i wodnym roztworem węgla potasowego i osusza nad siarczanem sodowym. Odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszcza w ciepłym octanie etylu i oziębia. Otrzymuje się Z-Thr-Pro-NH_2 ; temperatura topnienia 148° , $[\alpha]_D^{20} = -72^\circ$ w 95% kwasie octowym. Następnie rozpuszcza się 90 g Z-Thr-NH_2 w 2 litrach dioksanu i 260 ml 1 n kwasu solnego i uwodornia w temperaturze 20° pod normalnym ciśnieniem w obecności katalizatora palladowego. Przesącza się, odparowuje roztwór pod zmniejszonym ciśnieniem, przemycia krystaliczną pozostałość octanem etylu i otrzymuje $\text{H-Thr-Pro-NH}_2 \cdot \text{HCl}$; temperatura topnienia 216°C , $[\alpha]_D^{20} = -64^\circ$ w 95% kwasie octowym.

b) Z-Ser-Gly-NHNH_2 .

Rozpuszcza się 14,5 g Z-Ser-OH w 100 ml chloroformu i dodaje 6,1 g N-metylmorfoliny; następnie wkrapla się 8,2 g estru izobutyloвого kwasu chloromrówkowego. Po 10 minutach dodaje się roztwór 6,5 g estru etylowego gliceryny w 50 ml chloroformu i miesza w ciągu 1 godziny w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną przemycia się rozcieńczonym amoniakiem, potem roztworem kwasu solnego, osusza nad siarczanem sodowym i odparowuje fazę organiczną. Przekrystalizowuje się otrzymany Z-Ser-Gly-OEt z octanu etylu. Temperatura topnienia 103° , $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ$ w dwumetyloformamidzie. Rozpuszcza się 19,4 g Z-Ser-Gly-OEt w 270 ml alkoholu etylowego, dodaje 27 ml wodzianu hydrazyny i pozostawia w ciągu dwóch dni w temperaturze pokojowej. Krystaliczną masę odsącza się, przemycia metanolem i suszy. Otrzymuje się Z-Ser-Gly-NHNH_2 , temperatura topnienia 180° , $[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

c) $\text{H-Ser-Gly-Thr-Pro-NH}_2$

Do 200 ml dwumetyloformamidu dodaje się 25 ml 4 n roztworu chlorowodoru w eterze etylowym i rozpuszcza się w tym 11 g Z-Ser-Gly-NHNH_2 . Następnie wkrapla się w temperaturze -10° 5,4 ml azotynu III-rzęd. butyloвого, dodaje się roztwór 18 ml trójetiloaminy i następnie przesącza. Równocześnie rozpuszcza się 12 g $\text{H-Thr-Pro-NH}_2 \cdot \text{HCl}$ w 100 ml dwumetyloformamidu, dodaje 6,2 ml trójetiloaminy, odsącza od wytrąconego chlorowodoru trójetiloaminy i dodaje do przesącza otrzymany wyżej roztwór azydku dwupeptydu. Pozostawia się na okres 2 godzin w temperaturze 0° , odparowuje do sucha, rozpuszcza pozostałość w mieszaninie 500 ml metanolu i 100 ml wody i przepuszcza się otrzymany roztwór przez kolumnę ze 100 ml Dowex-50 (postać H^+). Odparowuje się i przekrystalizowuje pozostałość z metanolu/octanu etylu. Otrzymuje się $\text{Z-Ser-Gly-Pro-NH}_2$ o temperaturze topnienia 132° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ w dwumetyloformamidzie. Rozpuszcza się 22 g $\text{Z-Ser-Gly-Thr-Pro-NH}_2$ w mieszaninie 440 ml metanolu i 88 ml wody i uwodornia w temperaturze 20° pod ciśnieniem normalnym w obecności palladu osadzonego na węglu. Następnie przesącza się odparowuje od sucha, pozostałość przemycia się eterem i suszy. Otrzymuje się $\text{H-Ser-Gly-Thr-Pro-NH}_2$ o temperaturze topnienia 95° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Sekwens składowy B: $\text{BOC-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-NHNH}_2$

a) Z-Asn-Thr-Gly-OEt .

Rozpuszcza się 43 g Z-Thr-Gly-OEt w 500 ml dwumetyloformamidu i uwodornia pod normalnym ciśnieniem w temperaturze pokojowej w obecności palladu osadzonego na węglu. Przesącza się, dodaje 60 g Z-Asn-OCP , pozostawia w ciągu 16 godzin w temperaturze 25° , zatęża do około 250 ml dodaje octanu etylu, przemycia za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego, suszy nad siarczanem sodowym i odparowuje do sucha. Pozostałość przemycia się octanem etylu i suszy. Otrzymuje się Z-Asn-Thr-Gly-OEt . Temperatura topnienia 225° , $[\alpha]_D^{20} = -4^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

b) $\text{Z-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt}$.

Rozpuszcza się 29 g Z-Asn-Thr-Gly-OEt w 700 ml dwumetyloformamidu, uwodornia pod normalnym ciśnieniem w temperaturze pokojowej w obecności palladu osadzonego na węglu, przesącza i zadaje przesącza za pomocą Z-Thr-N_3 , wytworzonego z 30 g Z-Thr-NHNH_2 (patrz sekwens składowy A a)). Po upływie 2 godzin w temperaturze 0° odparowuje się do sucha, przemycia pozostałość za pomocą wody, eteru i etanolu. Otrzymuje się $\text{Z-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt}$ o temperaturze topnienia 230° , $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

c) $\text{BOC-Arg(NO}_2\text{)-Thr-Asn-Thr-Gly-NHNH}_2$

Rozpuszcza się 22 g $\text{Z-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt}$ w 700 ml dwumetyloformamidu, uwodornia pod normalnym ciśnieniem w temperaturze pokojowej w obecności palladu osadzonego na węglu i przesącza. Rozpuszcza się 23 g $\text{BOC-Arg(NO}_2\text{)-OH}$ w 500 ml dwumetyloacetamidu, dodaje 12 ml trójetiloaminy, oziębia do temperatury -10° , dodaje 9,4 ml estru izobutyloвого kwasu chloromrówkowego, pozostawia się do reakcji na 10 minut i dodaje otrzymany powyżej roztwór cztero-peptydu. Po upływie 30 minut w temperaturze 25° dodaje się 100 ml wody, traktuje się otrzymany roztwór Amberlitem-IRA-410 (postać OH), aż do negatywnej reakcji na chlor,

przesącza i odparowuje do sucha. Przemycwa się pozostałość za pomocą chloroformu, octanu etylu i eteru i suszy. Otrzymuje się BOC-Arg(NO₂)-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt. Temperatura topnienia około 100°C, $[\alpha]_D^{20} = -4^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Rozpuszcza się 12 g BOC-Arg(NO₂)-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt w mieszaninie 200 ml kwasu octowego i 40 ml wody, uwodornia w obecności palladu osadzonego na węglu w temperaturze 20° pod normalnym ciśnieniem, przesącza i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 20° do sucha. Rozpuszcza się pozostałość w dwumetyloformamidzie i odparowuje. Czynność tę powtarza się tak długo, aż kwas octowy stanie się niewykrywalny. Rozpuszcza się pozostałość w 120 ml dwumetyloformamidu, dodaje 6 ml wodzianu hydrazyny, pozostawia na okres 16 godzin w temperaturze 25°, odparowuje, przemycwa pozostałość eterem, metanolem (eterem) 1 : 1 i następnie znowu eterem i suszy. Otrzymuje się BOC-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-NHNH₂, temperatura topnienia 175°C z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$ w dwumetyloformamidzie (1 n HCl (1 : 1)),

Sekwens składowy AB: H-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 2 CH₃COOH

Rozpuszcza się 13,5 g BOC-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-NHNH₂ (sekwens składowy B) w 270 ml dwumetyloformamidu (wody) (8 : 2), oziębia do temperatury -15°, dodaje 40 ml 4 n roztworu kwasu solnego w dioksanie i 2,5 ml azotynu III-rzęd.-butylowego. Miesza się w ciągu 10 minut w temperaturze -15°, dodaje 28 ml trójetiloaminy, odsącza dodaje 10,5 g H-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ (sekwens składowy A), miesza się w ciągu 16 godzin w temperaturze 0°. Następnie odparowuje się do sucha, przemycwa pozostałość eterem i suszy. Rozpuszcza się pozostałość w metanolu, dodaje dziesiątą część objętości wody oraz siedmiokrotną ilość chloroformu i przepuszcza się otrzymany roztwór przez kolumnę z 500 ml żelu krzemionkowego. Po eluowaniu wzrastającymi ilościami metanolu otrzymuje się po odparowaniu BOC-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂. Zawiesza się go w 200 ml 4 n roztworu kwasu solnego w dioksanie i miesza w ciągu 2 godzin w temperaturze 25°. Odparowuje się do sucha, rozpuszcza się pozostałość w 0,2 n kwasie octowym, zadaje amberlitem IRA-410 (postać octanowa) i, liofilizuje wodny roztwór. Następnie przemycwa się pozostałość eterem, octanem etylu i znowu eterem i suszy nad wiórkami wodorotlenku sodowego. Otrzymuje się H-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 2 CH₃COOH, temperatura topnienia 195° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -64^\circ$ w dwumetyloformamidzie (1 n HCl (1 : 1)).

Sekwens składowy C : Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Pro-OH

a) H-Thr-Tyr-Pro-OH

Rozpuszcza się 176 g Z-Tyr(Z)-Pro-OMe w 1000 ml metanolu/1 n HCl, uwodornia w obecności palladu osadzonego na węglu w temperaturze 20° pod ciśnieniem 1 atm i odparowuje. Rozpuszcza się pozostałość w 400 ml dwumetyloformamidu, dodaje w temperaturze 0° 100 ml trójetiloaminy, odsącza wykrystalizowany chlorowodorek trójetiloaminy i zadaje przesącz Z-Thr-N₃ (wytworzony z 87 g Z-Thr-NHNH₂, patrz sekwens składowy A a). Pozostawia się następnie na okres 16 godzin w temperaturze 0° odparowuje do sucha, rozpuszcza pozostałość w octanie etylu, przemycwa kolejno rozcieńczonym kwasem solnym i rozcieńczonym amoniakiem, osusza i odparowuje. Pulweryzuje się pozostałość w heptanie, przemycwa eterem naftowym i suszy. Otrzymuje się Z-Thr-Tyr-Pro-OMe, temperatura topnienia 80° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Rozpuszcza się 53 g Z-Thr-Tyr-Pro-OMe w 550 ml metanolu, dodaje 100 ml 2 n roztworu wodorotlenku sodowego, pozostawia w ciągu 1 godziny w temperaturze 25° dodaje 50 ml 2 n kwasu solnego, zatęża do około 200 ml, dodaje jeszcze 100 ml wody, nastawia wartość pH na 10, przemycwa wodny roztwór dwukrotnie octanem etylu, następnie nastawia za pomocą 4n kwasu solnego na wartość pH 1, ekstrahuje wydzielony trójetpeptyd Z-Thr-Tyr-Pro-OH octanem etylu, suszy i odparowuje. Temperatura topnienia 80°, $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ w dwumetyloformamidzie. Rozpuszcza się pozostałość w mieszaninie 500 ml dioksanu i 100 ml wody i uwodornia w temperaturze 20° pod normalnym ciśnieniem w obecności katalizatora palladowego. Przesącza się, odparowuje do sucha, przemycwa pozostałość eterem i suszy. Otrzymuje się H-Thr-Tyr-Pro-OH, temperatura topnienia 180° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$ w kwasie octowym (95%)

b) Z-Leu-Gln-OMe

Rozpuszcza się 70 g Z-Gln-OH w 1,5 litra dioksanu i dopuszcza się tak długo eterowy roztwór dwiazometanu, aż roztwór zostanie zabarwiony na żółto. Następnie roztwór odparowuje się i białą pozostałość przerabia się eterem. Otrzymuje się Z-Gln-OMe, temperatura topnienia 136°C, $[\alpha]_D^{20} = -21^\circ$ w dwumetyloformamidzie. Rozpuszcza się 71 g estru w 1,7 litra metanolu. Potem miesza się w ciągu 5 godzin 10% palladu osadzonego na węglu aktywnym z 59 ml 4 n kwasu solnego i dodaje do roztworu. Całość poddaje się 3-godzinnemu uwodornieniu w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem normalnym. Zużywa się przy tym około 83% teoretycznej ilości wodoru. Katalizator odsącza się, a przesącz całkowicie odparowuje, przy czym otrzymuje się H-Gln-OMe · HCl w postaci gęstego oleju. Rozpuszcza się 64 g Z-Leu-OH w 200 ml acetonitrylu, zadaje 27,7 g N-hydroksysukcynimidu i oziębia do temperatury -10°. Do tego wlewa się roztwór 50 g dwucykloheksylokarbodwuimidu w 100 ml acetonitrylu. Po upływie około 30 minut odsącza się dwucykloheksylomocznik.

Przesącz zadaje się 47,3 g $\text{H-Gln-OMe} \cdot \text{HCl}$, rozpuszczonego w dwumetyloformamidzie, przy równoczesnym dodaniu równoważnej ilości N-metylomorfoliny. Pozostawia się na okres 4 godzin i odparowuje. Pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu i przemycia 5% roztworem kwaśnego węgla sodowego, 1 n kwasem solnym i wodą. Organiczną fazę osusza się nad siarczanem sodowym i odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. Po przekrystalizowaniu z metanolu i eteru otrzymuje się Z-Leu-Gln-OMe , temperatura topnienia 179° , $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

c) $\text{Z-Lys(BOC)-Leu-Gln-OMe}$

42 g Z-Leu-Gln-OMe rozpuszcza się w 1500 ml metanolu. Następnie wprowadza się mieszając 16 g 10% palladu osadzonego na węglu aktywnym z 25,8 ml 4 n kwasu solnego i dodaje do roztworu. Całość poddaje się 8-godzinemu uwodornieniu w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem normalnym. Zużywa się przy tym 95% teoretycznej ilości wodoru. Katalizator odsąca się i przesącz odparowuje. Otrzymuje się $\text{H-Leu-Gln-OMe} \cdot \text{HCl}$ w postaci piany. Następnie rozpuszcza się $\text{H-Leu-Gln-OMe} \cdot \text{HCl}$ 300 ml dwumetyloformamidu, dodaje 34 g Z-Lys(BOC)-OCP i 8,4 ml trójetiloaminy. Po wytrząśnięciu pozostawia się na okres 16 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość traktuje się wodą i odsąca od wody. Następnie rozpuszcza się w małej ilości metanolu i wytrąca za pomocą eteru. Po odsączeniu i wysuszeniu otrzymuje się $\text{Z-Lys(BOC)-Leu-Gln-OMe}$, $[\alpha]_D^{20} = 21^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

d) $\text{Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-NH-NH}_2$

Rozpuszcza się 38 g $\text{Z-Lys(BOC)-Leu-Gln-OMe}$ w 300 ml dwumetyloformamidu, dodaje się 15 g 10% palladu osadzonego na węglu, uwodornia pod ciśnieniem normalnym w temperaturze pokojowej i odsąca katalizator. Następnie zadaje się Z-His-N_3 otrzymanym z 25,2 g Z-His-NHNH_2 pozostawia w ciągu 5 godzin w temperaturze pokojowej, odparowuje, rozpuszcza się pozostałość w octanie etylu, przemycia wodą, osusza nad siarczanem sodowym, odparowuje i przemycia pozostałość eterem. Otrzymuje się $\text{Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-OMe}$, temperatura topnienia 120° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ w dwumetyloformamidzie. Rozpuszcza się 33 g $\text{Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-OMe}$ w 330 ml metanolu, zadaje 7,5 ml wodzianu hydrazyny, pozostawia się w ciągu 2 dni w temperaturze 25° i następnie odparowuje do sucha. Potem rozpuszcza się w dwumetyloformamidzie odparowuje i powtarza to do chwili gdy żaden ślad hydrazyny nie da się więcej wykryć. Przemycia się pozostałość eterem, wodą i eterem, suszy i otrzymuje $\text{Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-NH-NH}_2$, temperatura topnienia 199° , $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ w metanolu.

e) $\text{Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Thr-Pro-OH}$

Rozpuszcza się 40 g $\text{Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-NH-NH}_2$ w 400 ml dwumetyloformamidu, oziębia do temperatury -20° , dodaje 75 ml mieszaniny dioksanu z 2 HCl i następnie 6 ml azotynu III-rzęd. butylowego, miesza w ciągu 10 minut w temperaturze -20° , dodaje 30 ml trójetiloaminy i 20 g H-Thr-Tyr-Pro-OH i pozostawia do reakcji w ciągu 16 godzin w temperaturze 25° . Potem odparowuje się do sucha, przemycia pozostałość eterem, rozcieńczonym kwasem octowym, eterem i w końcu gorącym octanem etylu. Potem osusza się w wysokiej próżni i otrzymuje $\text{Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH}$, temperatura topnienia 215° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Sekwens składowy Cl: $\text{Z-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH}$

a) H-Thr-Tyr-Pro-OH . Patrz sekwens składowy C a).

b) $\text{Z-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH}$.

Rozpuszcza się 40,1 g Z-Gln-ONP i 38,4 g H-Thr-Tyr-Pro-OH w 500 ml dwumetyloformamidu i zadaje 12,2 ml N-metylomorfoliny. Pozostawia się w ciągu 16 godzin w temperaturze pokojowej i potem odparowuje roztwór pod zmniejszonym ciśnieniem całkowicie. Odparowaną pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu/n-butanolu (10 : 1) i przemycia 1 n kwasem siarkowym (30% roztworem chlorku sodowego (1 : 1), a następnie 15% roztworem chlorku sodowego. Po osuszeniu nad siarczanem sodowym odparowuje się fazę organiczną całkowicie pod zmniejszonym ciśnieniem. Rozpuszcza się pozostałość w chloroformie /metanolu (1 : 1) i przesącza przez kolumnę z żelazem krzemionkowym (20-krotna ilość). Otrzymuje się $\text{Z-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH}$ w postaci piany, $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

c) $\text{Z-Lys(DOC)-Tyr-OMe}$

143,9 g $\text{Z-Lys(BOC)-OH} \cdot \text{DCHA}$ rozpuszcza się w 600 ml ciepłego dwumetyloformamidu i po oziębieniu do temperatury 35° zadaje się roztworem 65,1 g $\text{H-Tyr-OMe} \cdot \text{HCl}$ w 200 ml dwumetyloformamidu, przy czym wykryształizowuje całkowicie $\text{DCHA} \cdot \text{HCl}$. Po przesączeniu dodaje się do przesączu 30 g N-hydroksysukcynimidu, oziębia do temperatury -15° i zadaje roztworem 53,6 g dwucykloheksylokarbodwumidu w 200 ml acetonitrylu. Wytrząsa się w ciągu 15 godzin w temperaturze 0° , odsąca od dwucykloheksylomocznika i odparowuje przesącz pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu, przemycia się 5% roztworem kwaśnego węgla sodowego, wodą, 1 n kwasem siarkowym i wodą, osusza nad siarczanem sodowym i zagęszcza do stanu piany. Otrzymuje się w ten sposób $\text{Z-Lys(BOC)-Tyr-OMe}$, $[\alpha]_D^{20} = -6^\circ$ w metanolu.

d) Z-His-Lys(BOC)-Tyr-NHNH₂.

113,5 g Z-Lys(BOC)-Tyr-OMe rozpuszcza się w 2 litrach metanolu, zadaje zawiesinę 10 g 10% palladu osadzonego na węglu aktywnym w 50 ml 4n kwasu solnego i uwodornia się w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem normalnym. Po 3-godzinny uwodornianiu zużywa się 90% teoretycznej ilości wodoru. Katalizator odsąca się i przesącz całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. H-Lys(BOC)-Tyr-OMe · HCl w postaci piany jest jednolity w chromatografii cienkowarstwowej i wiąże go się z Z-His-N₃ w następujący sposób. Rozpuszcza się 88,5 g Z-His-NHNH₂ w 1800 ml dwumetyloformamidu, oziębia do temperatury -20°, dodaje 405 ml 3,7 n roztworu HCl w eterze i po kropli 36,6 ml azotynu III-rzęd.-butylowego. Po wymieszaniu w ciągu 10 minut w temperaturze -20° dodaje się 270 ml trójetyloaminy i roztwór H-Lys(BOC)-Tyr-OMe · HCl w 600 ml dwumetyloformamidu, który już zawiera 27,3 ml trójetyloaminy. Po upływie 5 godzin odsąca się wykryształizowany chlorowodorek trójetyloaminy. Przesącz odparowuje się całkowicie w wysokiej próżni. Pozostałość rozpuszcza się w mieszaninie kwasu octowego i wody (2 : 1), przemycza organiczną fazę czterokrotnie 15% roztworem chlorku sodowego, osusza nad siarczanem sodowym i odparowuje. Po rozpuszczeniu pozostałości w chloroformie/metanolu/ (98 : 2) i przesączeniu poprzez kolumnę z żelą krzemionkowym (25-krotna ilość otrzymuje się Z-His-Lys(BOC)-Tyr-OMe w postaci bezpostaciowej $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$ w dwumetyloformamidzie. Rozpuszcza się 90,4 g Z-His-Lys(BOC)-Tyr-OMe w 300 ml metanolu i zadaje się 20 ml wodzianu hydrazyny. Po 2 dniach stania krystalizuje wytworzony hydrazyd. Dodaje się 300 ml eteru, odsysa, przemycza eterem i osusza pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się w ten sposób Z-His-Lys(BOC)-Tyr-NHNH₂, temperatura topnienia 187°, $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

e) Z-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH

Rozpuszcza się 36,7 g Z-Gln-Thr-Thr-Pro-OH w 500 ml dwumetyloformamidu, dodaje 15 g 10% palladu osadzonego na węglu aktywnym, uwodornia w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem normalnym odsąca od katalizatora. Przesącz zawiera H-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH, który łączy się z Z-His-Lys(BOC)-Tyr-N₃ w następujący sposób: 40,4 g Z-His-Lys(BOC)-Tyr-NHNH₂ rozpuszcza się w 400 ml dwumetyloformamidu, oziębia do temperatury -20°, zadaje się 88 ml dioksanu /2n HCl i następnie oziębia do temperatury 7,3 ml azotynu III-rzęd.-butylowego. Po 10 minutach mieszania w temperaturze -20° dodaje się 37 ml trójetyloaminy i roztwór dwumetyloformamidu zawierający H-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH. Po upływie 5 godzin w temperaturze 20° odparowuje się mieszaninę całkowicie pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszcza się pozostałość w octanie etylu/n-butanolu (5 : 1), przemycza rozcieńczonym kwasem octowym z dodatkiem roztworu chlorku sodowego, osusza się nad siarczanem sodowym i zagęszcza. Niezupełnie odparowany olej zadaje się eterem, dobrze przerabia i odsysa. Po wysuszeniu w wysokiej próżni otrzymuje się Z-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH, temperatura topnienia 193° $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Sekwens składowy ABC: H-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 3 CH₃-COOH

Rozpuszcza się 10 g heptapeptydu (sekwens składowy C) w 100 ml dwumetyloformamidu, odparowuje, rozpuszcza się pozostałość w 100 ml dwumetyloformamidu, 15 g N-hydroksysukcynimidu, oziębia się do temperatury 0°, dodaje 5 g dwucykloheksylokarboduimidu, pozostawia do reakcji na okres 3 godzin, przesącza wytrącony dwucykloheksylokarboduimid, zalewa do 30 ml i wytrąca otrzymany ester hydroksysukcynimidowy heptapeptydu Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-OSu dodatkiem eteru. Po przemyciu eterem rozpuszcza się pozostałość w 100 ml dwumetyloformamidu, zadaje 10 g amidu nonapeptydu (sekwens AB) i pozostawia do reakcji w ciągu 16 godzin. Dodaje się 500 ml octanu etylu i przesącza. Rozpuszcza się pozostałość w dwumetyloformamidzie, dodaje 10 ml kwasu octowego i ponownie wytrąca octanem etylu. Odsąca się, przemycza octanem etylu i eterem i suszy. Otrzymuje się Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 2 AcOH, $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ w dwumetyloformamidzie, który bezpośrednio rozpuszcza się w 80% w kwasie octowym. Następnie dodaje się 5 g palladu osadzonego na węglu i uwodornia w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem normalnym. Przesącza się, odparowuje w wysokiej próżni do sucha i przemycza pozostałość eterem. Po wysuszeniu ponad wiórkami KOH otrzymuje się sekwens składowy ABC, temperatura topnienia 170° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -53^\circ$ w 1n kwasie octowym.

Sekwens składowy ABCI: H-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 3 CH₃COOH

Według analogicznego sposobu jak przy otrzymywaniu sekwensu składowego ABC otrzymuje się z 10 g nonapeptydu (sekwens składowy CI) i 10 g nonapeptydu (sekwens składowy AB) sekwens składowy ABCI, temperatura topnienia 166° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$ w 1n kwasie octowym.

Sekwens składowy D: Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-NHNH₂.

a) Z-Glu(OTB)-Leu-OMe

Rozpuszcza się 151 g Z-Glu(OTB)-OH, 54 g N-hydroksysukcynimidu w 700 ml acetonitrylu i oziębia do temperatury -20°. Następnie dodaje się 96,5 g dwucykloheksylokarboduimidu, rozpuszczonego w 350 ml

acetonitrylu. Po upływie około 30 minut odsąca się powstały dwucykloheksylomocznik. Do przesączu dodaje się 71,2 g H-Leu-OMe, potem pozostawia się na okres 4 godzin i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Stałą pozostałość zadaje się octanem etylu /wodą (2 : 1). Organiczną fazę przemycia się następnie 5% roztworem kwaśnego węgla sodowego, wodą i rozcieńczonym kwasem siarkowym (pH = 3), po przemyciu do odczynu obojętnego osusza się nad siarczanem sodowym i odparowuje. Pozostałość rozpuszcza się w chloroformie, do którego dodano 1% metanolu i przesącza przez kolumnę z żelą krzemionkowym (10-krotna ilość). Otrzymuje się Z-Glu(OTB)-Leu-OMe, temperatura topnienia 31° $[\alpha]_D^{20} = -12^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

b) H-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe

Rozpuszcza się 118 g Z-Glu(OTB)-Leu-OMe w 2000 ml metanolu. Potem miesza się 15 g 10% palladu osadzonego na węglu aktywnym z 63 ml 4 n kwasu solnego i dodaje do roztworu. Całość poddaje się uwodornieniu w ciągu 2 godzin w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem normalnym. Zużywa się przy tym 85% teoretycznej ilości wodoru. Katalizator odsąca się i przesącz całkowicie odparowuje, przy czym otrzymuje się H-Glu(OTB)-Leu-OMe. HCl w postaci bezpostaciowej piany.

91,7 g Z-Gln-ONP i 93,8 g H-Glu(OTB)-Leu-OMe · HCl rozpuszcza się w 500 ml dwumetyloformamidu i zadaje 51 ml N-metylomorfoliny. Pozostawia się w ciągu 15 godzin w temperaturze pokojowej i następnie odparowuje roztwór całkowicie pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną w ten sposób pozostałość przerabia się z wodą i odsąca od wody. Następnie przekrystalizowuje się z metanolu. Otrzymuje się Z-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe, temperatura topnienia 210° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -40^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

Rozpuszcza się 44,4 g Z-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe w 1200 ml metanolu/dwumetyloformamidu (1 : 1). Potem zadaje się 15 g 10% palladu osadzonego na węglu aktywnym w 50 ml wody i dodaje do roztworu. Po około 2 godzinach uwodorniania zużywa się prawie teoretyczną ilość wodoru. Katalizator odsąca się i przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu i trzykrotnie przemycia nasyconym roztworem chlorku sodowego. Organiczną fazę osusza się nad siarczanem sodowym i odparowuje przesącz do około 1/3 pierwotnej objętości. Po dodaniu eteru naftowego stały trójętyd daje się odsączyć. Otrzymuje się H-Gln(OTB)Leu-OMe, temperatura topnienia 123° , $[\alpha]_D^{20} = -14^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

c) Z-Lys(BOC)-Leu-Ser-OMe.

Rozpuszcza się 43 g H-Leu-Ser-Ome · HCl i 80 g Z-Lys(BOC)-OCP w 400 ml dwumetyloformamidu, dodaje 22 ml trójętyloaminy, pozostawia na okres 25 godzin w temperaturze 25° , odsąca wydzieloną trójętyloaminę i odparowuje przesącz do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu, przemycia rozcieńczonym kwasem solnym oraz rozcieńczonym roztworem kwaśnego węgla potasowego, osusza nad siarczanem sodowym, odsąca i odparowuje. Przekrystalizowuje się pozostałość z octanu etylu/eteru i otrzymuje Z-Lys(BOC)-Leu-Ser-OMe, temperatura topnienia 110° $[\alpha]_D^{20} = -14^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

d) Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-NHNH₂.

Rozpuszcza się 158 g Trt-Gly-OH w 2000 ml dwuchlorometanu i 72 ml trójętyloaminy, oziębia do temperatury -5° , zadaje 50 ml estru etylowego kwasu chloromrówkowego i miesza w ciągu 10 minut w temperaturze -5° . Równocześnie rozpuszcza się 300 g Z-Lys(BOC)-Leu-Ser-OMe w 3000 ml dioksanu/wody (8 : 2), uwodornia w obecności palladu osadzonego na węglu w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem normalnym, odsąca i odparowuje. Pozostałość rozpuszcza się w chloroformie i zadaje się wyżej otrzymanym mieszanym bezwodnikiem. Pozostawia się na okres 1 godziny w temperaturze 0° , przemycia roztwór chloroformowy rozcieńczonym kwasem octowym i następnie rozcieńczonym roztworem kwaśnego węgla potasowego, osusza i odparowuje do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w 1250 ml metanolu, zadaje 175 ml wodzianu hydrazyny i pozostawia na okres 16 godzin w temperaturze 25° . Zatęża się do 500 ml, zadaje wodą, przesącza, przemycia pozostałość wodą i osusza nad pięciotlenkiem fosforu; Otrzymuje się Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-NHNH₂, temperatura topnienia 204° $[\alpha]_D^{20} = -6^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie.

e) Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-NHNH₂. Rozpuszcza się w 76 g Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-NHNH₂ w 300 ml dwumetyloformamidu, oziębia do temperatury -20° , dodaje 75 ml dioksanu/ 4n HCl i następnie 11,6 ml azotynu III-rzęd.-butylowego, miesza w ciągu 10 minut w temperaturze -15° , zadaje 70 ml trójętyloaminy i 49,5 g H-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe. Potem miesza się w ciągu 16 godzin w temperaturze 0° . Odsąca się wytrącony chlorowodorek trójętyloaminy, zatęża przesącz do około 100 ml i zadaje pozostałość wodą. Odsąca się wydzieloną pozostałość, którą następnie przemycia się wodą i w końcu suszy w wysokiej próżni w temperaturze 50° . Pozostałość wygotowuje się z octanem etylu, przemycia eterem i suszy. Otrzymany ester nonapeptydu Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe o temperaturze topnienia 234° , $[\alpha]_D^{20} = -20^{\circ}$ w dwumetyloformamidzie, rozpuszcza się w 200 ml dwumetyloformamidu, zadaje 4 ml hydrazyny i pozostawia na okres 24 godzin w temperaturze 25° . Po zatężeniu do około 100 ml dodaje się 500 ml wody, odsąca wytrąconą substancję przemycia wodą do odczynu obojętnego i osusza nad pięciotlenkiem fosforu

w temperaturze 50°. Otrzymuje się Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-NHNH₂, temperatura topnienia 265°, $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ w dwumetyloformamidzie/wodzie (8 : 2).

Sekwens składowy ABCD: H-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 3 Ac OH · 3 H₂O.

Rozpuszcza się 3 g hydrazidu heptapeptydu (sekwens składowy D) w 30 ml dwumetyloformamidu, oziębia do temperatury -20°, dodaje 2 ml dioksanu (4n HCl i następnie 0,3 ml azotynu III-rzęd. butylowego. Miesza się w ciągu 10 minut w temperaturze -20°, dodaje 2 ml trójetyloaminy i 3 g amidu heksadekapeptydu (sekwens składowy ABC), miesza się w ciągu 16 godzin w temperaturze 0° i odparowuje do sucha. Przemycia się pozostałość w temperaturze 0° rozcieńczonym kwasem octowym i następnie wodą, przesącza, rozpuszcza się pozostałość w metanolu/wodzie (9 : 1), sączy przez żel krzemionkowy, odparowuje pozostałość przemycia octanem etylu, rozpuszcza się w 200 ml 80% kwasu octowego, pozostawia na okres 4 godzin w temperaturze 25°, odparowuje w temperaturze 20° do sucha, przemycia pozostałość eterem, octanem etylu i eterem przesącza i suszy. Otrzymuje się sekwens składowy ABCD, temperatura topnienia 240° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -38^\circ$ w kwasie octowym.

Sekwens składowy DI: Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-NHNH₂

a) Z-Gln-Leu-OMe.

Rozpuszcza się 40,1 g Z-Gln-ONP i 19,1 g H-Leu-OMe. HCl w 300 ml dwumetyloformamidu, dodaje 34,1 ml N-metylomorfoliny i pozostawia na okres 15 godzin w temperaturze 20° mieszając od czasu do czasu. Następnie roztwór reakcyjny odparowuje się całkowicie pod wysoką próżnią. Pozostałość maceruje się dobrze z wodą i przesącza. Po krystalizacji z metanolu otrzymuje się Z-Gln-Leu-OMe, temperatura topnienia 168°, $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

b) H-Gln-Gln-Leu-OMe

Rozpuszcza się 27,8 g Z-Gln-Leu-OMe w 130 ml kwasu octowego i zadaje 220 ml 40% bromowodoru w kwasie octowym. Całość pozostawia się w ciągu 1 godziny mieszając od czasu do czasu. Po całkowitym odparowaniu pod zmniejszonym ciśnieniem pozostałość pulweryzuje się w bezwodnym eterze. Po odsączeniu silnie higroskopijny H-Gln-Leu-OMe · HBr w stanie zwilżenia eterem suszy się w suszarce w temperaturze pokojowej.

77,5 g Z-Gln-ONP i 81,4g H-Gln-Leu-OMe · HBr rozpuszcza się w 750 ml dwumetyloformamidu i zadaje 66,5 ml N-metylomorfoliny. Pozostawia się na okres 15 godzin w temperaturze pokojowej i następnie odparowuje roztwór całkowicie pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną w ten sposób pozostałość maceruje się dobrze z wodą i odsącza od wody. Pozostałość po odsączeniu maceruje się acetonem i za pomocą prasy oddziela się fazę acetonową. Po wysuszeniu pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymuje się Z-Gln-Gln-Leu-OMe, temperatura topnienia 238°, $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ w dwumetyloformamidzie. Rozpuszcza się 54,8 g Z-Gln-Gln-Leu-OMe w 1200 ml dwumetyloformamidu. Potem dodaje się do tego roztworu zawieszinę 10 g 10% palladu osadzonego na węglu aktywnym w 70 ml wody. Po około 1 godzinie uwodornienia w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem normalnym zużywa się stechiometryczną ilość wodoru. Katalizator odsącza się, a przesącz odparowuje się całkowicie pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość przekrystalizowuje się z metanolu/eteru. Otrzymuje się H-Gln-Gln-Leu-OMe, temperatura topnienia 151°, $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

c) Z-Lys(BOC)-Leu-Ser-OMe. Patrz sekwens składowy D c).

d) Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-NHNH₂. Patrz sekwens składowy D d).

e) Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-NHNH₂.

Przy zastosowaniu tego samego sposobu jak opisano dla sekwensu składowego D e), przy czym zastępuje się H-Gln-Glu (OTB)-Leu-OMe przez taką samą ilość H-Gln-Gln-Leu-OMe, otrzymuje się Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-NHNH₂, temperatura topnienia 270°, $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ w dwumetyloformamidzie/wodzie (8 : 2).

Sekwens składowy ABCDI: H-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 3 AcOH · 3 H₂O.

0 Przy zastosowaniu tego samego sposobu jak dla wytwarzania sekwensu składowego ABCD oraz przy zastąpieniu sekwensu składowego D przez taką samą ilość sekwensu składowego DI otrzymuje się sekwens składowy ABCDI, temperatura topnienia 245° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ$ w kwasie octowym.

Sekwens składowy ABCID: H-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Adn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · AcOH · 3 H₂O

Przy zastosowaniu tego samego sposobu jak dla wytwarzania sekwensu składowego ABCD oraz przy zastąpieniu sekwensu składowego D przez taką samą ilość sekwensu składowego DI,

Przy zastosowaniu tego samego sposobu jak dla wytwarzania sekwensu składowego ABCD i przy zastąpieniu sekwensu składowego ABC przez taką samą ilość sekwensu składowego ABC1, otrzymuje się sekwens składowy ABC1D, temperatura topnienia 230° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ$ w kwasie octowym.

Sekwens składowy E: H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH

a) H-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe · HBr

Rozpuszcza się 21,0 g Z-Cys(Bzl)-OCP i 12,3 g H-Val-Leu-OMe · HCl w 120 ml dwumetyloformamidu. Potem dodaje się do tego 5,9 ml trójetiloaminy, pozostawia się w ciągu 16 godzin w temperaturze 25°, dodaje octanu etylu, przemywa rozcieńczonym kwasem solnym, suszy nad siarczanem sodowym, odparowuje do sucha i krystalizuje pozostałość z octanu etylu/eteru etylowego. Otrzymuje się Z-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe, temperatura topnienia 160°, $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$ w dwumetyloformamidzie, który rozpuszcza się w 210 ml 40% roztworu bromowodoru w kwasie octowym. Pozostawia się na okres 1 godziny w temperaturze 25°, odparowuje do sucha i przekrystalizowuje pozostałość z izopropanolu/eteru etylowego. Otrzymuje się H-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe · HBr, temperatura topnienia 168°, $[\alpha]_D^{20} = +14^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

b) H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe · 1,3 HBr

Rozpuszcza się 20 g Z-Thr-NHNH₂ w 350 ml dwumetyloformamidu, oziębia do temperatury -20°, dodaje 100 ml roztworu 2n kwasu solnego w diokasnie i następnie jeszcze 10 ml azotynu III-rzęd.-butylowego. Po upływie 10 minut w temperaturze -20° dodaje się 45 ml trójetiloaminy i 25,5 g H-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe · HBr i otrzymaną mieszaninę wytrząsa się w ciągu 16 godzin w temperaturze 0°. Odparowuje się do sucha, rozpuszcza się pozostałość w mieszaninie octan etylu/woda, przemywa organiczną fazę rozcieńczonym kwasem solnym, osusza nad siarczanem sodowym, odparowuje i przekrystalizowuje pozostałość z octanu etylu. Otrzymuje się Z-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe; temperatura topnienia 208°, $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Rozpuszcza się 20 g otrzymanego wyżej czteropeptydu w 200 ml mieszaniny kwasu trójfluorooctowego i octanu etylu (1 : 1) przepuszcza w ciągu 1 godziny w temperaturze 0° strumień gazowego bromowodoru, następnie odparowuje się i krystalizuje się pozostałość z metanolu/eteru etylowego. Otrzymuje się H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe · 1,3 HBr, temperatura topnienia 202°, $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

c) H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH

Rozpuszcza się 372 g H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe · 1,3 HBr w 1800 ml metanolu, dodaje 900 ml 2n roztworu wodorotlenku sodowego pozostawia w ciągu 1 godziny w temperaturze 25°, dodaje 240 ml kwasu octowego i pozostawia na okres 2 godzin w temperaturze 0°. Odsąca się wydzieloną krystaliczną masę, przemywa ją najpierw 1n kwasem octowym, następnie wodą i suszy w temperaturze 50° w wysokiej próżni. Otrzymuje się H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH, temperatura topnienia 219° $[\alpha]_D^{20} = -53^\circ$ w 1n amoniaku.

Sekwens składowy F: BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂

a) H-Asn-Leu-Ser-OMe · HCl

Rozpuszcza się 43 g H-Leu-Ser-OMe · HCl i 53 g BOC-Asn-ONP w 400 ml dwumetyloformamidu, dodaje 22 ml trójetiloaminy, pozostawia na okres 16 godzin w temperaturze 25° odparowuje do sucha i krystalizuje pozostałość z metanolu. Otrzymuje się BOC-Asn-Leu-Ser-OMe, temperatura topnienia 190°, $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$ w dwumetyloformamidzie, który rozpuszcza się w 500 ml 4n roztworu kwasu solnego w metanolu. Pozostawia się na okres 1 godziny w temperaturze 25°, odparowuje do sucha, rozpuszcza pozostałość w metanolu i wytrąca eterem etylowym. Otrzymuje się H-Asn-Leu-Ser-OMe · HCl, temperatura topnienia 180°, $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

b) H-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe · HCl.

Rozpuszcza się 39,5 g BOC-Ser-NHNH₂ w 500 ml dwumetyloformamidu, oziębia do temperatury -20°, dodaje 200 ml 2n roztworu kwasu solnego w diokasnie i następnie 20 ml azotynu III-rzęd.-butylowego. Po upływie 10 minut w temperaturze -20° dodaje się 90 ml trójetiloaminy i 38,0 g H-Asn-Leu-Ser-OMe · HCl, potem miesza się w ciągu 16 godzin w temperaturze 0°, odparowuje do sucha i pozostałość przekrystalizowuje z chloroformu/eteru etylowego. Otrzymuje się BOC-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe, temperatura topnienia 135°, $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ w dwumetyloformamidzie, który rozpuszcza się w 420 ml 4n roztworu kwasu solnego w metanolu. Pozostawia się na okres 1 godziny w temperaturze 25°, odparowuje do sucha i przekrystalizowuje z metanolu/octanu etylu/. Otrzymuje się H-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe · HCl, temperatura topnienia 155° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

c) BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂

Rozpuszcza się 18,5 g H-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe · HCl i 18 g BOC-Cys(Bzl)-ONP w 100 ml dwumetyloformamidu, dodaje się 10 ml wody, 3,5 ml kwasu octowego i 5,6 ml trójetiloaminy, pozostawia na okres 16 godzin w temperaturze 25°, odparowuje do sucha i przekrystalizowuje z metanolu. Otrzymuje się BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe, temperatura topnienia 182°, $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$ w dwumetyloformamidzie, który przy słabym ogrzewaniu rozpuszcza się 200 ml dwumetyloformamidu. Dodaje się 200 ml metanolu i 20 ml wodzianu hydrazyny, pozostawia na okres 16 godzin w temperaturze 30°, wytrąca za pomocą eteru etylowego, przemywa osad eterem etylowym/metanolem (1 : 1) i suszy otrzymany w ten sposób BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂, temperatura topnienia 224°, $[\alpha]_D^{20} = -13^\circ$ w dwumetyloformamidzie. Sekwens składowy EF: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH.

Rozpuszcza się 18,4 g BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂ (sekwens składowy F) w 150 ml dwumetyloformamidu, oziębia do temperatury -20°, dodaje 40 ml 2n roztworu chlorowodoru w dioksanie i 15 ml azotynu III-rzęd.-butylowego. Po upływie 10 minut w temperaturze -20° dodaje się jeszcze 28 ml trójetyleaminy i 16,2 g H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH (sekwens składowy E) i miesza w ciągu 16 godzin w temperaturze 25°. Potem odsącza się, roztwór odparowuje, a pozostałość przemywa 1n kwasem octowym. Otrzymuje się BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH, temperatura topnienia 217°, $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$ w dwumetyloformamidzie. Rozpuszcza się otrzymany produkt w 5000 ml suchego amoniaku, dodaje się przy mieszaniu i wrzeniu amoniaku sodu metalicznego aż do ciemno niebieskiego zabarwienia. W celu odbarwienia dodaje się chlorku amonowego. Odparowuje się do sucha i przemywa pozostałość 1n roztworem kwasu octowego i acetonu. Po wysuszeniu otrzymuje się BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH, temperatura topnienia 248° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -41^\circ$ w dwumetyloformamidzie/ wodzie (3 : 1). Rozpuszcza się otrzymany nonapeptyd w 5000 ml 0,01 n roztworu amoniaku, dodaje mieszając 1n roztworu nadtlenu wodoru, aż do negatywnej reakcji na nitroprusydek, potem jeszcze 200 ml kwasu octowego, przesącza i liofilizuje. Otrzymuje się BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH, temperatura topnienia 238° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ w dwumetyloformamidzie/ wodzie (3 : 1).

Sekwens składowy EF1: Piv-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH.

BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH (sekwens składowy EF) rozpuszcza się w 300 ml kwasu trójfluorooctowego, pozostawia na okres 30 minut w temperaturze 25°, odparowuje pozostałość przemywa się octanem etylu i rozpuszcza się w 300 ml dwumetyloformamidu. Do tego roztworu dodaje się 30 g estru p-nitrofenylowego kwasu piwalinowego, wytworzonego w opisany poniżej sposób, jak również 14 ml trójetyleaminy, pozostawia na okres 16 godzin w temperaturze 25°, odparowuje i przemywa pozostałość chloroformem. Rozpuszcza się w 300 ml dwumetyloformamidu, dodaje 50 ml wody i 50 g Dowex-50, miesza w ciągu 15 minut, przesącza, przemywa żywicę dwumetyloformamidem i odparowuje przesącz do sucha. Przemywa się pozostałość najpierw chloroformem, następnie octanem etylu i suszy. Otrzymuje się Piv-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH, temperatura topnienia 234°, $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$ w dwumetyloformamidzie/ wodzie (3 : 1).

Ester p-nitrofenylowy kwasu piwalinowego.

Rozpuszcza się 95 g kwasu piwalinowego i 131 g p-nitrofenolu w 1000 ml octanu etylu, dodaje 197 g dwucykloheksylokarbodwuimidu, miesza w ciągu 2 godzin w temperaturze 25°, przesącza, odparowuje przesącz i krystalizuje pozostałość z mieszaniny octan etylu-eter naftowy. Otrzymuje się ester p-nitrofenylowy kwasu piwalinowego, temperatura topnienia 104°.

Sekwens składowy EF2: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH.

Wychodząc z sekwensu składowego EF oraz estru etylowo-p-nitrofenylowego kwasu węglowego, który wytwarza się w sposób poniżej opisany, otrzymuje się sekwens składowy EF2 według tego samego sposobu jak opisano dla wytworzenia sekwensu składowego EF1. Temperatura topnienia 263°, $[\alpha]_D^{20} = 21^\circ$ w dwumetyloformamidzie/ wodzie (3 : 1).

Ester etylu-p-nitrofenylowy kwasu węglowego.

Rozpuszcza się 200 g p-nitrofenolu i 113 ml pirydyny w 1200 ml octanu etylu, oziębia do temperatury 0°, dodaje mieszając 156 ml estru etylowego kwasu chloromrówkowego, miesza jeszcze w ciągu 30 minut w temperaturze 0°, przemywa wodą, osusza nad Na₂SO₄ i odparowuje do sucha. Rozpuszcza się pozostałość w eterze etylowym i krystalizuje ester etylu-p-nitrofenylowy kwasu węglowego przez dodanie eteru naftowego, temperatura topnienia 65°.

Sekwens składowy F3: Bzl-MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-NH-NH₂

a) H-Asn-Leu-Ser-OMe · HCl Patrz sekwens składowy F a).

b) H-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe · HCl Patrz sekwens składowy F b).

c) Bzl-MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂

Wychodząc z 18,5 g H-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe · HCl i 13,5 g Bzl-MCP-ONP otrzymuje się, według tego samego sposobu jak dla wytwarzania sekwensu składowego F c), Bzl-MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂, temperatura topnienia 251°, $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ w dwumetyloformamidzie.

Sekwens składowy EF3: MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-NHNH₂.

Rozpuszcza się 16,2 g Bzl-MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂ (sekwens składowy F3) w 150 ml dwumetyloformamidu, oziębia do temperatury -20° dodaje 40 ml 2 n roztworu kwasu solnego w dioksanie i 15 ml azotynu III-rzęd.-butylowego. Po upływie 10 minut w temperaturze -20° dodaje się jeszcze 28 ml trójetyleaminy i 24,8 g H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe · 1,3 HBr (sekwens składowy E b) i miesza w ciągu 16 godzin w temperaturze 25°. Potem przesącza się, roztwór odparowuje, a pozostałość przemywa gorącym metanolem. Otrzymuje się Bzl-MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe, temperatura topnienia 244°, $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ w dwumetyloformamidzie, który rozpuszcza się w temperaturze 60° w 100 ml dwumetyloformamidu, dodaje 10 ml wodzianu

hydrazyny i pozostawia na okres 2 godzin w temperaturze 60°. Otrzymany hydrazyd nonapeptydu wykrystalizowuje. Przemycza się eterem etylowym, wodą i metanolem i osusza pod wysoką próżnią nad pięciotlenkiem fosforu. Otrzymuje się hydrazyd nonapeptydu, temperatura topnienia 265°, $[\alpha]_D^{20} = -35^\circ$ w dwumetyloformamidzie/wodzie (3 : 1).

Otrzymany produkt rozpuszcza się w 5000 ml suchego amoniaku, dodaje mieszając przy wrzeniu amoniaku sól metaliczny aż do ciemnoniebieskiego zabarwienia. W celu odbarwienia dodaje się chlorku amonowego i potem przepuszcza się przez roztwór strumień powietrza aż do negatywnej reakcji nitroprusydkowej. Odparowuje się do sucha i przemycza pozostałość wodą i acetonem. Po wysuszeniu otrzymuje się MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-NHNH₂, temperatura topnienia 278°, $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ w dwumetyloformamidzie/wodzie (3 : 1).

Przykład II. BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 2 CH₃ COOH · 3 H₂O.

Rozpuszcza się 1,0 g nonapeptydu (sekwens składowy EF) w 10 ml dwumetyloformamidu, dodaje 1,5 g N-hydroksysukcynimidu i 0,52 g dwucykloheksylokarbodwuimidu, miesza się w czasie 6 godzin w temperaturze 25°, przesącza i odparowuje przesącz do sucha. Przemycza się pozostałość octanem etylu i eterem etylowym i suszy. Otrzymuje się BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OSu, temperatura topnienia 242°, który rozpuszcza się w 10 ml dwumetyloformamidu. Do tego roztworu dodaje się 3,1 g dwuocanu trikozapeptydu (sekwens składowy ABCD) i 1,2 g N-hydroksysukcynimidu i miesza w ciągu 16 godzin w temperaturze 25°. Odparowuje się do sucha, przemycza pozostałość eterem etylowym, chloroformem i acetonem. Otrzymuje się w ten sposób surowy chroniony dotriakontapeptyd, który rozpuszcza się w 50 ml mieszaniny chloroform/metanol/woda (70 : 30 : 5). Otrzymanym roztworem nawarstwia się kolumnę z żelalem krzemionkowym, którą uprzednio wyrównano wymienioną powyżej mieszaniną. Eluowanie przeprowadza się za pomocą metanolu o wzrastającym stężeniu. Połączone frakcje zawierające czysty peptyd odparowuje się, następnie przemycza eterem etylowym i osusza nad wodorotlenkiem potasowym w wysokiej próżni. Otrzymuje się związek wymieniony w tytule, temperatura topnienia 230° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$ w 50% kwasie octowym.

Przykład III. H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Len-His-Lys-Leu-Gln-H-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 6 CH₃ COOH · 10 H₂O

Rozpuszcza się 3,3 g chronionego dwuocanu trójwodzianu dotriakontapeptydu (przykład II) w atmosferze azotu w 100 ml kwasu trójfluorooctowego, pozostawia nokres 15 minut w temperaturze 20° i odparowuje do sucha. Rozpuszcza się w 300 ml 0,2 n roztworu kwasu octowego, zadaje 20 ml amberlitu IRA-410 (octan), liofilizuje, przemycza eterem etylowym i osusza nad wodorotlenkiem potasowym, w wysokiej próżni. Otrzymuje się związek wymieniony w tytule, temperatura topnienia 220° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -46^\circ$ w 50% kwasie octowym.

Przykład IV. Piv-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 2 CH₃ COOH · 3 H₂O

Postępując w sposób opisany w przykładzie II i stosując jako produkt wyjściowy sekwens składowy EF1 i ABCD, otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 220° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$ w 50% kwasie octowym.

Przykład V. Piv-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 6 CH₃ COOH · 8 H₂O

Postępując w sposób opisany w przykładzie III i stosując jako produkt wyjściowy dotriakontapeptyd z przykładu IV, otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 216° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -49^\circ$ w 50% kwasie octowym.

Przykład VI. BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-isLys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 2 CH₃ COOH · 3 H₂O.

Postępując według przykładu II i stosując jako produkt wyjściowy sekwensy składowe EF2 i ABCD, otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 230° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$ w 50% kwasie octowym.

Przykład VII. BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 6 CH₃ COOH · 8 H₂O

Postępując według przykładu III i stosując jako produkt wyjściowy dotriakontapeptyd z przykładu VI, otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 240° z rozkładem $[\alpha]_D^{20} = -52^\circ$ w 50% kwasie octowym.

Przykład VIII. MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-L-SBOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 2 CH₃ COOH · 3 H₂O

Postępując według przykładu II i stosując jako produkty wyjściowe sekwensy składowe EF3 i ABCD, otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 230° rozkład, $[\alpha]_D^{20} = -45^{\circ}$ w 50% kwasie octowym.

Przykład IX. MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 6 CH₃COOH · 8 H₂O

Postępując według przykładu III i stosując jako produkt wyjściowy dotriakontapeptyd z przykładu VIII, otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 220° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -60^{\circ}$ w 50% kwasie octowym.

Przykład X. BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · CH₃COOH · 3 H₂O.

Postępując według przykładu II i stosując jako produkty wyjściowe sekwensy składowe EF i ABCDI, otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 235° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -46^{\circ}$ w 50% kwasie octowym.

Przykład XI. H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 6 CH₃COOH · 10 H₂O

Rozpuszcza się 1,05 g hydrazidu oktaptydu (sekwens składowy EF3) w mieszaninie 50 ml dwumetyloformamidu i 1,2 ml dioksanu/2n HCl w temperaturze -20° . Dodaje się 0,116 ml azotynu III-rzęd.butylowego, miesza w ciągu 10 minut w temperaturze -20°C , dodaje 1,4 ml trójetyloaminy i 3,1 g dwuocanu trikozapeptydu (sekwens składowy ABCD) i 5 ml wody i miesza w ciągu 16 godzin w temperaturze 0°C . Odparowuje się do sucha, przemywa pozostałość eterem etylowym, chloroformem i acetonem. Otrzymany w ten sposób surowy peptyd rozpuszcza się w 100 ml 0,3 n kwasu octowego, traktuje 20 ml Amberlitu-IRA-410(octan) i dodaje 50 ml 0,6 n wodorotlenku amonowego. Nastawia się wartość pH na 6,5 i przepuszcza się otrzymany roztwór przez kolumnę wypełnioną karboksymetylocelulozą (10 X 100 cm) którą wyrównano za pomocą roztworu buforowego 0,15 n octanu amonowego. Eluowanie prowadzi się za pomocą buforu octanu amonowego o wzrastającym stopniu stężenia i wartości pH = (0,15–0,4 n; pH = 6,5–7,0). Połączone frakcje zawierające czysty peptyd liofilizuje się trzykrotnie, pozostałość przemywa się etanolem i następnie eterem etylowym i osusza się nad wodorotlenkiem potasowym w wysokiej próżni. Otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 230° (rozkład) $[\alpha]_D^{20} = 45^{\circ}$ w 50% kwasie octowym.

Przykład XII. BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 2 CH₃COOH · 3 H₂O.

Postępując według przykładu III i stosując jako produkty wyjściowe sekwensy składowe EF i ABCID, otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 230° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = -45^{\circ}$ w 50% kwasie octowym.

Przykład XIII. H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 6 CH₃COOH · 10 H₂O

Postępując według przykładu III i stosując jako produkt wyjściowy dotriakontapeptyd z przykładu XII otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 216° z rozkładem, $[\alpha]_D^{20} = 43^{\circ}$ w 50% kwasie octowym.

Przykład XIV. BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 2 CH₃COOH · 3 H₂O

Postępując według przykładu II i stosując jako produkty wyjściowe sekwensy składowe EF i ABCIDI, otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 235° (rozkład, $[\alpha]_D^{20} = -43^{\circ}$ w 1n kwasie octowym/metanolu (2 : 1).

Przykład XV. H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-His-Lys-Tyr-Gln-Thr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ · 6 CH₃COOH · 10 H₂O

Postępując według przykładu III i stosując jako produkt wyjściowy dotriakontapeptyd z przykładu XIV otrzymuje się związek tytułowy o temperaturze topnienia 216° (rozkład), $[\alpha]_D^{20} = -43^{\circ}$ w 1n kwasie octowym.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowych polipeptydów lub pochodnych polipeptydów o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku, w którym X oznacza atom wodoru, grupę aminową, grupę R—CO—NH—, w której R oznacza alkil, ewentualnie podstawiony aralkil lub ewentualnie podstawiony aryl albo grupę R'—O—CO—NH—,

w której R' oznacza alkil, alkenyl, ewentualnie podstawiony aralkil lub ewentualnie podstawiony aryl, przy czym reszta R' nie daje się odszczepiać kwasem trójfluorooctowym, a Y oznacza amid L-proliny lub amid L-prolino-L-waliny, oraz w którym reszta L-serylowa może być wymieniona przez resztę L-treonylową lub resztę L-alanylową, reszta L-asparaginylowa może być wymieniona na resztę L-aspartylową, L-glutaminylową lub L-glutamylową, resztę L-aspartylową, L-glutaminylową lub L-glutamylową, reszta L-treonylowa może być wymieniona na resztę L-serylową lub L-alanylową, reszta L-lizylova może być wymieniona na resztę BOC-lizylową, L-ornitylową lub L-arginylova, reszta L-glutaminylova może być wymieniona na resztę L-glutamylova może być wymieniona na resztę OTB-glutamylova, L-glutaminylova, L-asparaginylova lub L-aspartylową, reszta L-leucylova może być wymieniona na resztę L-tyrozylova, reszta L-tyrozylova może być wymieniona na resztę L-fenylalaninylova i reszta L-arginylova może być wymieniona na resztę L-ornitylova lub L-lizylova, ich terapeutycznie czynnych soli addycyjnych z kwasami i kompleksów z metalami ciężkimi, z n a m i e n n y t y m, że wymienione w powyższym wzorze aminokwasy względnie ich pochodne kondensuje się w kolejności podanej w tym wzorze pojedynczo lub po utworzeniu mniejszych jednostek peptydowych, przy czym aminokwas lub peptyd o chronionej grupie α -aminowej i aktywowanej końcowej grupie karboksylowej poddaje się reakcji z aminokwasem lub peptydem o wolnej grupie α -aminowej i wolnej lub chronionej końcowej grupie karboksylowej, a aminokwas lub peptyd o aktywowanej grupie α -aminowej i chronionej końcowej grupie karboksylowej poddaje się reakcji z aminokwasem lub peptydem o wolnej końcowej grupie karboksylowej i chronionej grupie α -aminowej, przy czym wolne grupy funkcyjne nie biorące udziału w reakcji równocześnie chroni się, po zakończeniu kondensacji odszczepia zbędne grupy ochronne, przy czym w dowolnym momencie syntezy grupę karboksylową występującą w położeniu końcowym reszty Pro względnie Pro-Val przeprowadza się po jej zaktywowaniu w grupę amidową drogą reakcji z amoniakiem, grupę merkaptu po utworzeniu sekwencji częściowej 1-7 utlenia się, w przypadku, gdy w położeniu 1 występuje grupa merkaptu-propionylowa, przed utlenianiem grup merkaptu występującą w położeniu 2 grupę L-Ser alLo części składowe peptydu zawierające tę grupę L-Ser kondensuje się z ewentualnie aktywowaną pochodną kwasu propionowego i tak otrzymane produkty końcowe przeprowadza się w znany sposób za pomocą organicznych lub nieorganicznych kwasów w terapeutycznie czynne sole addycyjne z kwasami albo w kompleksy z metalami ciężkimi.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że od

III-rzęd.butyloksykarbonylo-L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucyloglicylo- ϵ -III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo- γ -butoksy-L-glutamylo-L-leucylo-L-histydilo- ϵ -III-rzęd.-butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamidu

odszczepia się grupy ochronne, otrzymując

L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutamylo-L-leucylo-L-histydilo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamid.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że

od III-rzęd.butyloksykarbonylo-L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucyloglicylo- ϵ -III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydilo- ϵ -III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamidu

odszczepia się grupy ochronne, otrzymując

L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydilo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinoamid.

4. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że

od III-rzęd.butyloksykarbonylo-L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucyloglicylo- ϵ -III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo- γ -III-rzęd.butoksy L-glutamylo-L-leucylo-L-histydilo- ϵ -III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-tyrozylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamidu

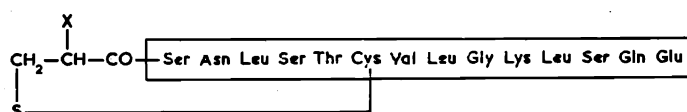
odszczepia się grupy ochronne, otrzymując

L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-

glicylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutamylo-L-leucylo-L-histydylo-L-lizylo-L-tyrozylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamid.

5. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że od III-rzęd.butyloksykarbonylo-L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-tyrozylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamidu odszczepia się grupy ochronne, otrzymując L-hemicystynylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutaminylo-L-leucylo-L-histydylo-L-lizylo-L-tyrozylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamid.

6. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że od β-merkaptopropionylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-cysteinylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-N-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-γ-III-rzęd.butoksy-L-glutamylo-L-leucylo-L-histydylo-N-ε-III-rzęd.butoksykarbonylo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-arginylo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamidu odszczepia się grupy ochronne, otrzymując β-merkaptopropionylo-L-serylo-L-asparaginylo-L-leucylo-L-serylo-L-treonylo-L-hemicystynylo-L-walilo-L-leucylo-glicylo-L-lizylo-L-leucylo-L-serylo-L-glutaminylo-L-glutamylo-L-leucylo-L-histydylo-L-lizylo-L-leucylo-L-glutaminylo-L-treonylo-L-tyrozylo-L-prolilo-L-treonylo-L-asparaginylo-L-treonylo-glicylo-L-serylo-glicylo-L-treonylo-L-prolinamid.



$\boxed{\text{Leu His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Gly Thr Y}}$