

2 BIBLIOTEKA
U.P. PRL

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

63362

Patent dodatkowy
do patentu

Kl. 12 q, 6/01

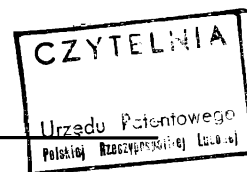
Zgłoszono: 29.XII.1967 (P 124 417)

Pierwszeństwo: 30.XII.1966 Szwajcaria

MKP C 07 c, 103/52

Opublikowano: 25.IX.1971

UKD



Właściciel patentu: CIBA Société Anonyme, Bazylea (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania nowego peptydu o działaniu ACTH

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego peptydu o działaniu ACTH o wzorze amidu D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo -L-norleucylo-L-glutamylo-L-histydilo-L-feniloalanilo -L-arginilo-L-tryptofilo-glicylo -L-lizylo -L-prolilo-L-walilo-glicylo -L-lizylo-L-lizylo-L-lizyny, jak również peptydu zawierającego zamiast reszty glutamylowej resztę glutaminy oraz ich addycyjnych soli z kwasami i związków kompleksowych.

Znane są np. z opisu patentowego nr 59570, peptydy o działaniu ACTH, zawierające aminokwas o konfiguracji D jako pierwszy aminokwas od amidowego końca sekwencji.

Peptydy te, w porównaniu z dotychczas znanymi charakteryzują się wyższą aktywnością adrenokortykotropową, przy czym szczególnie wysoką aktywność wykazują peptydy o sekwencji Dser¹-β¹⁻¹⁹-kortykotropiny.

Wadą tych peptydów jest to, że grupy arginylo-we umiejscowione w położeniu 17,18 ze względu na obecność grupy guanidowej w bocznym łańcuchu aminokwasu, stanowią przeszkodę steryczną, w znacznym stopniu utrudniającą syntezę tych związków.

Stwierdzono, że można wytworzyć amid okta-dekapeptydu o znacznie wyższej aktywności adrenokortykotropowej, jeżeli we fragmentach użytych do jego syntezy zastąpi się odpowiednio, grupę metio-niny, usytuowaną w związku końcowym w położe-

2

niu 4, grupą norleucyny, a reszty arginyłowe w położeniu 17,18 resztami lizyny.

Wytworzony amid o sekwencji D-ser¹-norleu⁴-liz^{17,18}-β¹⁻¹⁸-kortykotropino-liz¹⁸ jest łatwiejszy do syntezy od znanej D-ser¹-β¹⁻¹⁹-kortykotropiny gdyż nie zawiera reszt arginyłowych w położeniu 17,18 utrudniających przebieg syntezy.

Otrzymany sposobem według wynalazku peptyd można przeprowadzić w sole addycyjne z kwasami lub w związki kompleksowe. Jako addycyjne sole z kwasami wymienić należy szczególnie sole kwasów nadających się do stosowania terapeutycznego, takich jak kwas solny, kwas octowy, zwłaszcza trudno rozpuszczalne sole jak siarczany, fosforany lub sulfoniany.

Pod pojęciem związków kompleksowych należy rozumieć związki kompleksowe o nie wyjaśnionej strukturze, powstające przy traktowaniu peptydów związkami organicznymi lub nieorganicznymi, powodującymi przedłużenie adrenokortykotropowej aktywności peptydu. Takimi organicznymi substancjami są związki metali takich jak wapń, magnez, glin, kobalt, a zwłaszcza cynk, korzystnie trudno rozpuszczalne sole jak fosforany, pirofosforany jak również wodorotlenki tych metali.

Substancjami organicznymi powodującymi przedłużenie działania są np. nieantygenowe żelatyny, np. oksypoliżelatyna, poliwinylpiperolidon i karbo-ksymetyloceluloza, jak również sulfoniany lub fosforany kwasu alginowego, dekstryny, polifenoli i

polialkoholi, zwłaszcza fosforan polifloretyny i kwasu fitynowego, jak i polimery i kopolimery kwasów aminowych, np. protamina a w szczególności aminokwasów wykazujących przeważający udział kwaśnych α -aminokwasów, jak kwas glutaminowy i asparaginowy.

Nowe związki wykazują silniejszą aktywność ACTH od tych peptydów, które zawierają w sekwencji jako pierwszy aminokwas, aminokwas o konfiguracji L i dlatego też mogą one być stosowane w medycynie i weterynarii, np. zamiast hormonów naturalnych.

Nowe peptydy wytwarza się znanymi metodami otrzymywania długołańcuchowych peptydów, przy zastosowaniu D-seryny jako N-końcowego aminokwasu. Aminokwasy łączy się w obranej kolejności pojedynczo lub po uprzednim utworzeniu z nich mniejszych jednostek peptydowych. W końcowym etapie syntezy grupy ochraniające odszczepia się jedno- lub ewentualnie wielostopniowe.

Sposób według wynalazku polega na tym, że z amidu D-serylo-L-tyrozylo -L-serylo-L-norleucylo-L-glutamyl-L-histydyl -L-fenylalanilo -L-arginilo-L-tryptofilo-glicylo -L-lizylo-L-prolilo -L-walilo-glicylo -L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizyny lub odpowiedniego związku, który zamiast reszty glutamylowej posiada resztę glutaminy, w których to peptydach chronione są, co najmniej grupa α -aminowa i grupy aminowe, w łańcuchach bocznych, jak też końcowa grupa karboksylowa i ewentualnie grupy karboksylowe obecne w łańcuchach bocznych, odszczepia się grupy ochronne i otrzymane związki ewentualnie przeprowadza się w ich addycyjne sole z kwasami lub w związki kompleksowe.

Łączenie się aminokwasów i/lub jednostek peptydowych odbywa się w ten sposób, że aminokwas lub peptyd posiadający chronioną grupę α -aminową i aktywowaną końcową grupę karboksylową poddaje się reakcji z aminokwasem lub peptydem z wolną grupą α -aminową i wolną lub chronioną, np. estryfikowaną lub amidowaną końcową grupą karboksylową albo aminokwas lub peptyd z aktywowaną grupą α -aminową i chronioną końcową grupą karboksylową poddaje się reakcji wymiany z aminokwasem lub peptydem o wolnej grupie karboksylowej i chronionej grupie α -aminowej.

Grupa karboksylowa może zostać uaktywniona przez przeprowadzenie w kwasowy halogenek, azydek, bezwodnik, imidazolid, izoksazolid lub aktywowany ester jak ester cyjanometylowy, karboksymetylowy, p-nitrofenylowy, lub przez reakcję z karbodwuimidem (ewentualnie z dodatkiem imidu N-hydroksybursztynowego) lub N,N'-karbonyldwuimidazolem. Grupę aminową można uaktywnić np. poprzez reakcję z amidofosforanem. Jako najczęściej stosowane metody wymienić należy metody: karbodwuimidową, azydową, metodę uaktywnionego estru i metodę bezwodnikową. Należy również wymienić syntezę opartą na nośniku będącym substancją stałą, w której peptyd zostaje rozbudowany od końca karboksylowego, związanego w formie estrowej w polimer poprzez kondensację z kolejnymi aminokwasami.

Nie biorące udziału w reakcji wolne, funkcyjne grupy chroni się za pomocą reszt łatwo dających

się odszczepiać na drodze hydrolizy lub redukcji. Grupy karboksylowe chronione są szczególnie przez estryfikację, np. metanolem, III-rzęd. butanolem, alkoholem benzylovym, alkoholem p-nitrobenzylovym, grupy aminowe natomiast są chronione przez wprowadzenie grupy tozylowej, trójfenylo-metylowej, formylowej, trójfliuoroacetylowej, o-nitrofenylosulfenylowej, ftalilowej lub grupy karbobenzoksylowej, lub barwnych grup ochronnych jak grupa p-fenylazobenzylloksykarbonylowa i p/p'-metoksyfenyloazo/-benzylloksykarbonylowa, lub w szczególności reszty III-rzęd. butylloksykarbonylowej.

Do ochrony grupy aminowej w ugrupowaniu guanidowym argininy stosuje się grupę nitrową, wspomniana grupa aminowa nie musi jednak być koniecznie chroniona w czasie reakcji. Grupa iminowa histydyny może być ochraniać przez resztę benzylovą lub trójfenylo-metylovą.

Przekształcenie chronionej grupy aminowej lub iminowej w wolną grupę, jak również przeprowadzenie funkcyjnie zmienionej grupy karboksylowej w wolną grupę karboksylową następuje w toku procesu znanymi metodami przez traktowanie środkami hydrolizującymi lub redukującymi.

Korzystny sposób polega na tym, że trzy pierwsze aminokwasy zawarte w trójpetydzie H-D-ser-tyr-OH (skrótowy sposób pisania odnosi się do L-aminokwasów, jeżeli D nie jest wyszczególnione) lub ponadto 4 aminokwasy zawarte w tetrapetydzie kondensuje się z następnymi aminokwasami heptapetydu lub heksapetydu aż do 10 aminokwasów, korzystnie stosując metodę azydową, a następnie otrzymany dekapetyd kondensuje się z amidem oktapetydowym do aminokwasów 11—18. Przy tej kondensacji stosuje się jako metodę sprzęgania korzystnie metodę karbodwuimidową lub metodę uaktywnionego estru, przede wszystkim za pomocą estru p-nitrofenylowego. W ostatnim przypadku ester p-nitrofenylowy dekapetydu nie musi być wyizolowany, lecz może się tworzyć sam w etapie kondensacji z dekapetydem posiadającego wolną grupę karboksylową, p-nitrofenolu i dwucykloheksylokarbodwuimidu.

Dekapetyd przedstawia się więc jako α -amino chroniony peptyd posiadający wolną grupę karboksylową lub grupę p-nitrofenyloestrową. Bocznołańcuchowe grupy aminowe znajdujące się w peptydach przeznaczonych do kondensowania są przeważnie chronione przez grupę III-rzęd.-butylloksykarbonylową, a grupa karboksylowa przez grupę III-rzęd. butyloestrową. Grupy ochronne mogą być odszczepione w ostatnim stopniu procesu za pomocą kwasu trójfliuorooctowego.

W zależności od sposobu postępowania otrzymuje się nowe związki w postaci zasad lub ich soli. Z soli można otrzymać w znany sposób zasady. Z tych ostatnich można otrzymać ponownie sole przez reakcję z kwasami stosowanymi do wytwarzania soli o działaniu terapeutycznym np. przez reakcję z kwasami nieorganicznymi jak kwasy chlorowcowodorowe, np. kwas solny, kwas bromowodorowy, kwas nadchlorowy, kwas azotowy, kwas tiocyjanowy, kwasy siarkowe, lub fosforowe, lub z kwasami organicznymi jak kwas mrówkowy,

kwasy octowy, kwas propionowy, glikolowy, mlekowy, pirogronowy, szczawiowy, malonowy, bursztynowy, maleinowy, fumarowy, jabłkowy, winowy, cytrynowy, askorbinowy, hydroksymaleinowy, dwuhydroksymaleinowy, benzoowy, fenylowy, kwas 4-aminobenzoowy, 4-hydroksybenzoowy, antranilowy, cynamonowy, kwas migdałowy, salicylowy, 4-aminosalicylowy, 2-fenoksybenzoowy, 2-acetoksybenzoowy, metanosulfonowy, etanosulfonowy, hydroksyetanosulfonowy, benzenosulfonowy, p-toluenosulfonowy, naftalenosulfonowy lub kwas sulfanilowy.

Otrzymane według wynalazku peptydy mogą znaleźć zastosowanie w postaci preparatów farmaceutycznych. Preparaty te zawierają peptydy w mieszaninie z farmaceutycznymi, organicznymi lub nieorganicznymi substancjami będącymi nośnikami nadającymi się do stosowania ustnego lub pozajelitowo.

Do tego samego celu mogą służyć również substancje nie reagujące z polipeptydami jak na przykład żelatyna, cukier mlekowy, glukoza, sól kuchenna, skrobia, stearynian magnezu, talk, oleje roślinne, alkohole benzylowe, guma roślinna, polialkilenoglikole, wazelina, cholesteryna, lub inne znane nośniki leków.

Preparaty farmaceutyczne mogą występować na przykład jako liofilizaty lub w postaci płynnej jako roztwory, zawiesiny lub emulsje. Ewentualnie są one również sterylizowane i/albo zawierają środki pomocnicze, jak środki konserwujące, stabilizujące, zwilżające lub emulgujące. Mogą one zawierać również inne terapeutycznie cenne substancje. Można je np. łączyć z dodatkami używanymi w terapii ACTH w celu przedłużenia działania, jak np. oksypolizelatyna, fosforanem polifloretyny, karboksymetylocelulozę lub z wyżej wspomnianymi trudno rozpuszczalnymi związkami metali, w szczególności fosforanami, pirofosforanami lub wodorotlenkiem cynku.

W celu przedłużenia aktywności, nowe peptydy można przeprowadzić w ich kompleksy z polimerami lub kopolimerami aminokwasów, zwłaszcza takich, które wykazują przeważający udział kwasnych α -aminokwasów jak kwas glutaminowy lub asparaginowy o konfiguracji L-, D- lub D, L-. Wspomniane polimery lub kopolimery wykazują w łańcuchach bocznych wolne grupy karboksylowe, podczas gdy końcowa grupa karboksylowa jest wolna lub funkcjonalnie zmieniona i może np. występować jako grupa estrowa lub jako niepodstawiona lub podstawiona przez reszty węglowodorowe, przede wszystkim niższe grupy alkilowe, grupa amidowa.

Ciepota cząsteczkowy polimerów może wahać się w granicach 10000—100000, przeważnie jednak wynosi 20000—80000. Do wytwarzania preparatów stosuje się korzystnie rozpuszczalną w wodzie, fizjologicznie przyswajalną sól, np. sól sodową lub amonową, lub sól z jedną organiczną zasadą jak trójetylamina, prokaina, dwubenzylamina, lub innymi trzyczlorowymi zasadami zawierającymi azot.

Polimery są znane lub można je wytworzyć znany sposóbami, np. według metod opisanych przez M. Idelsona i współautorów (J. Am. Chem. Soc. 80,

4631 [1958]). Można np. poddać reakcji ester III-rzęd.-butylowy- lub ester γ -benzylowy- α -karboksybezwodnika kwasu glutaminowego, w środowisku dioksanu z amoniakiem lub aminą, występujących w określonym stosunku molowym, np. 100:1 (w zależności od żadanego stopnia polimeryzacji) i po zakończeniu procesu polimeryzacji odłączyć grupy ochronne, np. grupę benzylową za pomocą bromowodoru w lodowatym kwasie octowym, grupę III-rzęd.-butylową kwasem trifluorooctowym.

W celu wytworzenia polimerów o jednolitej, określonej długości łańcucha, można je również syntetyzować znanymi w chemii peptydów metodami (metoda karbodwuimidowa, metoda azydowa i tym podobne). Stężenie polimerów w preparatach farmaceutycznych zależy od rozpuszczalności odpowiednich soli oraz od lepkości. Polimer powinien występować w preparatach w formie rozpuszczonej (odpowiedniej do podawania w postaci zastrzyków).

Sposób według wynalazku opisano w poniższym przykładzie. Temperatury podane są w stopniach Celsjusza.

Chromatograficzne cienkowarstwowe układy oznaczone następująco:

Układ 43 A: III-rzęd.-alkohol amylowy — izopropanol-woda (67:26:7)

Układ 43 C: III-rzęd.-alkohol amylowy — izopropanol-woda (51:21:28)

Układ 52: n-butanol — lodowaty kwas octowy-woda (100:10:30)

Układ 52 A: n-butanol — lodowaty kwas octowy-woda (67:10:23)

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

Układ 101: n-butanol-pirydyna — lodowaty kwas octowy-woda (38:24:8:30)

Zastosowano następujące skróty:

Z = grupa karboksylowa
BOC = grupa III-rzęd.-butyloksykarbonylowa
tBu = grupa III-rzęd.-butylowa

Przykład 1) H-norleu-OCH₃

Tworzy się zawiesinę z 18,4 g L-norleucyny i 57 g metanolu i dodaje w ciągu 30 minut w temperaturze -15°C podczas mieszania 11 ml chlorku tionylu. Miesza się jeszcze przez dalsze 30 minut w temperaturze -15°C , a następnie prowadzi się je w temperaturze 0°C i pokojowej, po 90 minut w każdej temperaturze. Po 3 godzinach stania w temperaturze 40°C roztwór odparowuje się do sucha w temperaturze 35°C , a pozostałość krystalizuje z mieszaniny aceton-heksan (2:1). Temperatura topnienia uzyskanego związku wynosi $140-141^{\circ}\text{C}$.

18,1 g chlorowodoru otrzymanego w wyżej podany sposób rozpuszcza się w 20 ml wody, przykrywa 200 ml warstwą eterową i zadaje w temperaturze 0°C 40 ml zimnego nasyconego roztworu węglanu wapnia. Fazę wodną ekstrahuje się kilkakrotnie eterem, następnie wszystkie ekstrakty eterowo zlewa się razem, osusza bezwodnym siarczanem sodu i odparowuje pod wysoką próżnią w temperaturze 0°C . Otrzymany wolny ester ma postać przezroczystego oleju.

2) BOC-ser-norleu-OCH₃

Roztwór składający się z 22,3 g wodzianu BOC-L-seryny w 270 ml acetonitrylu zadaje się roztworem składającym się z 14,3 g estru metylowego L-norleucyny w 65 ml acetonitrylu. Mieszaninę oziębia się do -5°C, dodaje 22,7 g karbodwuimidu dwucykloheksyloвого w 35 ml acetonitrylu, miesza jeszcze godzinę w temperaturze -5°C, a następnie przez noc w temperaturze 0°C, uwalnia od dwucykloheksylomocznika i odparowuje roztwór w temperaturze 35°C. Pozostałość przenosi się do octanu etylu, roztwór przemywa 1 n roztworem kwasu solnego, 1 n roztworem kwaśnego węgla sodu i nasyconym roztworem chlorku sodu, a następnie odparowuje. Krystaliczny dwupeptyd topnieje w temperaturze 69—71°C.

3) H-ser-norleu-OCH₃

28,0 g BOC-ser-norleu-OCH₃ rozpuszcza się w 320 ml 90% kwasu trójfluorooctowego i pozostawia na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po zagęszczeniu roztworu do połowy jego pierwotnej objętości, zadaje się go 500 ml eteru, przy czym wykrystalizowuje trójfluorooctan.

24,2 g trójfluorooctanu rozpuszcza się w 35 ml wody, roztwór zadaje się 700 ml chloroformu i mieszając w temperaturze 0°C dodaje 210 ml nasyconego roztworu węgla potasu. Z fazy chloroformowej uzyskuje 16,1 g krystalicznego estru dwupeptydu posiadającego temperaturę topnienia 84—85°C.

4) BOC-tyr-ser-norleu-OCH₃

19,6 g BOC-tyr-OH i 16,1 H-ser-norleu-OCH₃ rozpuszcza się w mieszaninie składającej się z 350 ml acetonitrylu i 17,5 ml dwumetyloformamidu, zadaje się w temperaturze -5°C roztworem zawierającym 15,9 g karbodwuimidu dwucykloheksyloвого w 175 ml acetonitrylu, a następnie miesza się w ciągu 1 godziny w temperaturze -5°C, potem przez całą noc w temperaturze 0°C. Mieszaninę uwalnia się od dwucykloheksylomocznika, przemywa podanym wyżej sposobem i roztwór odparowuje. Ochroniany ester trójpeptydowy po przekrystalizowaniu topnieje w temperaturze 143—145°C.

5) H-tyr-ser-norleu-OCH₃

27,3 g chronionego estru trójpeptydowego rozpuszcza się w metanолоwym roztworze zawierającym 82,5 ml 1n-kwasu solnego, pozostawia na 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie zadaje się eterem w objętości 1,5 litra. Otrzymuje się chlorowoderek wolnego estru trójpeptydowego, który po przekrystalizowaniu topi się w temperaturze 218—220°C (rozkład).

14,2 g otrzymanego chlorowodorku rozpuszcza się w 20 ml wody zawierającej warstwę eterową w objętości 400 ml i zadaje, w temperaturze 0°C, 100 ml nasyconego roztworu węgla potasu. Wolna zasada po przekrystalizowaniu topnieje w temperaturze 84—86°C.

6) BOC-D-ser-tyr-norleu-OCH₃

13,4 g H-tyr-ser-norleu-OCH₃ rozpuszcza się w 250 ml acetonitrylu i po dodaniu 15 ml dwumetyloformamidu zadaje 7,35 g BOC-D-seryny. W temperaturze -5°C dodaje się roztwór 7,45 g dwucykloheksylokarbodwuimidu w 30 ml acetonitrylu, następnie miesza się w temperaturze -5°C przez

1 godzinę, a potem przez całą noc w temperaturze 0°C. Roztwór uwalnia się od dwucykloheksylomocznika i odparowuje. Chroniony ester cztero-peptydowy topnieje po przekrystalizowaniu w temperaturze 149—151°C (rozkład).

7) BOC-D-ser-tyr-ser-norleu-NH-H-NH₂

11,65 g estru cztero-peptydowego rozpuszcza się w 50 ml metanolu, dodaje do roztworu 4,8 ml wodzianu hydrazyny i pozostawia mieszaninę w temperaturze pokojowej na przeciąg 24 godzin. Następnie dodaje się do mieszaniny 50 ml wody i miesza tak długo, aż żelazopodobny produkt w pełni nie przekrystalizuje. Uzyskany produkt topnieje w temperaturze 205—207°C.

8) BOC-D-ser-tyr-ser-norleu-glu-(OtBu)-his-fen-arg-try-gli-OH.

8,75 g BOC-D-ser-tyr-ser-norleu-NH-NH₂ rozpuszcza się w 75 ml dwumetyloformamidu i zadaje podczas mieszania w temperaturze -15°C, 20 ml 2 n roztworu chlorowodoru w lodowatym kwasie octowym. Następnie dodaje się 1,65 g trzeciorzędowego azotynu butylu, miesza roztwór w ciągu 10 minut w temperaturze -15°C i zadaje 5,5 ml trójetyloaminy. Tak otrzymany roztwór BOC-cztero-peptydoazydu wprowadza się kroplami do roztworu składającego się z 10 g H-glu-(OtBu)-his-fen-arg-try-gli-OH, 225 ml dwumetyloformamidu i 12 ml wody, oziębionego do temperatury -10°C.

Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu 20 godzin w temperaturze 0°C, a następnie zadaje 900 ml wody. Bezpostaciowy deka-peptyd odsącza się na nuczcy i przemywa roztworem dwumetyloformamidu (woda i dwumetyloformamid w stosunku 5:1) i acetonitrylem. Po powtórным wytrąceniu z wodnego acetonitrylu i usunięciu wilgoci powietrza otrzymuje się 12,9 g czystego ochronionego czterowodzianu deka-peptydu posiadającego temperaturę topnienia 215—218°C (rozkład); ($\frac{20}{D} = 18^\circ \pm 2^\circ/\text{c} = 0,5$ w roztworze pirydyna-woda 1:1). Cienkowarstwowy chromatogram na silikażelu wykazuje jednolitość związku: R_f (52) = 0,3.

9) BOC-D-ser-tyr-ser-norleu-glu-(OtBu)-his-fen-arg-try-gli-liz-(BOC)-pro-wal-gli-liz-(BOC)-liz-(BOC)-liz(BOC)-liz(BOC)-NH₂

1 g BOC-D-ser-tyr-ser-norleu-glu(OtBu)-his-fen-arg-try-gli-OH i 0,7 g H-liz(BOC)-pro-wal-gli-liz(BOC)-liz(BOC)-liz(BOC)-liz(BOC)-NH₂ (porównaj opis patentowy nr 59570), zawieszają się w 20 ml pirydyny i 0,83 ml 1 n roztworu kwasu solnego. Zawiesinę miesza się w ciągu 15 minut w temperaturze 50°C, następnie dodaje się 0,4 g dwucykloheksylokarbodwuimidu i miesza przez dalsze 3 godziny w temperaturze 50°C. W następnej kolejności dodaje się powtórnie taką samą ilość dwucykloheksylokarbodwuimidu i miesza przez dalsze 3 godziny w temperaturze 50°C. Potem usuwa się pod próżnią główną część pirydyny, pozostałość zadaje się 30 ml gorącego dwumetyloformamidu, rozciera i odfiltrówuje nierozpuszczone części.

Filtrat zagęszcza się w wysokiej próżni i temperaturze 40°C do objętości około 5 ml i zadaje dużą ilość wody. Wydzielony surowy produkt dobrze się rozdrabnia, odsącza na nuczcy, przemywa wodą i suszy. W celu dalszego oczyszczenia, produkt wy-

trąca się powtórnie z mieszaniny dwumetyloformamid-octan etylu, a następnie poddaje się przeciwpłądowemu rozdzielaniu w układzie rozpuszczalnika metanol-bufor-chloroform-czterochlorek węgla (bufor = 28,5 ml lodowatego kwasu octowego i 19,3 g octanu amonu w 960 ml wody). Po 120 operacjach rozdzielu, otrzymuje się z elementów nr 38–54 czystą pochodną amidu okta-dekapeptydu o ochronionych grupach (maksymalną wagową ilość produktu otrzymuje się z elementu nr 44, liczba podziału $K = 0,58$). Cienkowarstwowa chromatografia na płytkach silikażelowych wykazuje dla produktu następujące wartości R_f :

R_f w układzie chloroform-metanol (75 : 25) = 0,22
 R_f (43 A) = 0,46

Stosowany jako materiał wyjściowy chroniony amid okta-dekapeptydu — H-liz(BOC)-pro-wal-gli-liz(BOC)-liz(BOC)-liz(BOC)-NH₂ otrzymuje się metodą azydową poprzez kondensację Z-liz(BOC)-OH z H-liz(BOC)-OCH₃ w obecności dwucykloheksylokarbodiimidu, przeprowadzenie chronionego estru dwupeptydowego w amid za pomocą metanolu nasyconego gazowym amoniakiem, odszczepienie grupy karbobenzoksylowej za pomocą wody w obecności palladu na węglu i kondensację tak otrzymanego H-liz(BOC)-liz(BOC)-NH₂ z peptydem otrzymanym metodą azydkową, o wzorze Z-liz(BOC)-pro-wal-gli-liz(BOC)-liz(BOC)-NH-NH₂, omówionym w opisie patentowym NRF nr 1214242.

10) H-D-ser-tyr-ser-norleu-glu-his-fen-arg-try-gli-liz-pro-wal-gli-liz-liz-liz-liz-NH₂.

0,5 g chronionego, oczyszczonego w przeciwpłądowym rozdziale amidu okta-dekapeptydu rozpuszcza się w 10 ml lodowato zimnego 90% kwasu trójfluorooctowego i pozostawia roztwór przez 1 godzinę w temperaturze 25°C. Następnie roztwór zateża się pod próżnią do niewielkiej objętości i następnie poprzez dodanie dużej ilości eteru, wolnego od nadtlenu, wytrąca się kwaśną, trójfluorooctanową sól wolnego amidu okta-dekapeptydu. Hygroskopijny produkt odsąca się na nuczyci, przemywa eterem i suszy. W celu przekształcenia w octan produkt rozpuszcza się w 1% kwasie octowym, przepuszcza przez kolumnę wypełnioną słabo zasadowym wymieniaczem jonowym (Merck Nr II), skąd odbiera się produkt w postaci octanowej i przemywa powtórnie 1% kwasem octowym.

Do eluatu dodaje się n-oktanol i odparowuje pod próżnią w temperaturze 40°C. Pozostałość po oddzieleniu oktanolu przemywa się eterem naftowym i suszy. W dalszej kolejności produkt rozpuszcza się w niewielkiej ilości wody i liofilizuje. Otrzymuje się octan amidu okta-dekapeptydu, amidu D-ser¹-norleu⁴-liz^{17/18}-β¹-18-kortykotropino-liz¹⁸, w postaci suchego, prawie białego proszku. Amid

okta-dekapeptydu wykazuje przy elektroforezie bi-bułowej przy pH 6,3 długość przesuwu wynoszącą 10 cm (względem katody) (papier: Scheicher i Schüll 2043)b; mgl; octan pirydyń-bufor, 1 godzina, 2000 V). W chromatogramie cienkowarstwowym na płytkach z tlenku glinu, produkt wykazuje następujące wartości R_f :

R_f (52 A) = 0,18

R_f (101) = 0,25

Wytworzony sposobem według wynalazku peptyd przechowuje się w warunkach następujących:

Octan amidu D-ser¹-norleu-liz^{17/18}-β¹-18-kortykotropino-liz¹⁸, miesza się w warunkach aseptycznych z polifloretynofosforanem sodowym i chlorkiem sodu i po wprowadzeniu do fiolek liofilizuje tak aby otrzymać suchą ampulkę zawierającą następujące składniki: 0,5 mg wyżej wymienionego actanu amidu, oraz 23,20 mg 86,5% polifloretynofosforanu sodowego i 12,28 mg chlorku sodu.

Otrzymany octan amidu można również (po uprzednim przesączeniu w warunkach sterylnych) przechowywać w postaci ampulek o składzie: 0,5 mg octanu amidu kortykotropiny, 280,0 mg żelatyny, 5,0 mg fenolu przy uzupełnieniu wymienionych składników wodą destylowaną do objętości 1,0 m.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego peptydu o działaniu ACTH, **znamienny tym**, że z amidu D-serylo-L-tyrozylo-L-serylo -L-norleucylo -L-glutamyllo-L-histydyllo-L-fenylalanilo -L-arginilo -L-tryptofilo-glicylo -L-lizylo-L-prolilo -L-walilo-glicylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizyny lub odpowiedniego związku, zawierającego zamiast reszty glutamylowej — resztę glutaminy, w których to peptydach, chronione są co najmniej grupa α-aminowa i grupy aminowe obecne w łańcuchach bocznych, jak też końcowa grupa karboksylowa i ewentualnie obecne w łańcuchach bocznych grupy karboksylowe, odszczepia się grupy ochronne i otrzymane związki ewentualnie przeprowadza się w ich addycyjne sole z kwasami i/lub związki kompleksowe.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że grupy ochronne odszczepia się z peptydu, w którym grupy aminowe chronione są przez grupę III-rzęd.-butyloksykarbonylową, a grupa karboksylowa przez grupę III-rzęd.-butyloestrową.

3. Sposób według zastrz. 1, 2, **znamienny tym**, że grupy ochronne odszczepia się na drodze hydrolizy kwaśnej.

4. Sposób według zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że grupy ochronne odszczepia się za pomocą kwasu trójfluorooctowego.