



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

MKP C07c 103/52

Zgłoszono: 09.05.69 (P. 133444)

Pierwszeństwo: 10.05.68 dla zastrz. 1—6
Szwajcaria

Int. Cl.² C07C 103/52

Zgłoszenie ogłoszono: 26.02.73

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1977

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Ciba — Geigy AG., Bazylea (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania peptydów zawierających cystynę

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania peptydów zawierających cystynę oraz ich pochodnych zawierających cysteinę fragmentów peptydowych.

W przyrodzie występują rozmaite peptydy zawierające cystynę, w których dwusiarczkowy mostek cystyny znajduje się w pierścieniu takie, jak np. oksytocyna, wazopresyna, wazotocyna, izotocyna, mezotocyna, hormon wzrostowy, tyrokalcytonina, insulina. Z drugiej strony jednak dwusiarczkowy mostek cystyny może również łączyć ze sobą prostoliniowe aminokwasy, jak to ma miejsce np. dla obu mostków dwusiarczkowych między łańcuchami A i B insuliny albo glutationu.

Znane są obecnie różne metody syntezy takich peptydów zawierających mostki dwusiarczkowe. Oprócz peptydów naturalnych z mostkami dwusiarczkowymi obecnie zsyntezowano już większą liczbę aktywnych analogów, np. dezamino-oksyto-
cynę, Ser⁴-oksyto-
cynę, Asn⁴-oksyto-
cynę, Val⁸-oksy-
to-
cynę, Tyr²-0-metylo/-oksyto-
cynę, Phe²-Arg⁸-wa-
zopresynę, Ph²-Lys⁸-wazopresynę, Ph²-Orn⁸-wazo-
presynę, Ile³-Arg⁸-wazopresynę, Asn⁴-Lys⁸-wazopre-
synę.

Zgodnie ze znanymi metodami wytwarzania mostka dwusiarczkowego najpierw z zawierającego obie przeznaczone do połączenia reszty cysteinowe frag-
mentu peptydowego o określonej sekwencji amino-
kwasów, w których grupy merkaptu zabezpieczone
są np. grupami karbobenzoksylowymi, benzyłowymi

2

mi albo trityłowymi, odszczepia się te grupy —
osłaniające, a więc: grupę benzyłową np. sodem w
ciekłym amoniaku, trityłową np. octanem ołowia-
nym i siarkowodorem albo 10%-owym kwasem soli-
nym, a następnie peptyd z wolnymi grupami mer-
kaptu utlenia się do dwusiarczku, np. za pomocą
1,2-dwujodoetanu albo tlenu. Opisany sposób po-
siada tę wadę, że wspomniane metody odszczepia-
nia grup ochronnych powodują reakcje uboczne,
zwłaszcza w przypadku bardziej wrażliwych pepty-
dów, co z kolei powoduje obniżenie wydajności.

Obecnie stwierdzono, że peptydy zawierające cy-
stynę oraz ich pochodne można wytwarzać w spo-
sób prostszy i z dużo większą wydajnością.

Sposobem według wynalazku peptydy zawierające
cystynę oraz ich pochodne wytwarza się z zawie-
rających cysteinę fragmentów peptydowych, w któ-
rych grupy merkaptu zabezpieczone są grupami tri-
tyłowymi, jeśli fragment peptydu zawierający dwie
reszty cysteiny lub fragmenty peptydowe, z któ-
rych każdy zawiera resztę cysteiny traktuje się
jodem w rozpuszczalniku organicznym, w którym
jod i peptyd przynajmniej częściowo rozpuszczają
się.

Reakcję prowadzi się w temperaturze 0—60°C,
korzystnie w temperaturze pokojowej. Reakcję pro-
wadzi się korzystnie w rozpuszczalniku w którym
jod i peptyd są co najmniej częściowo rozpuszczal-
ne, korzystnie w alkoholu takim, jak np. niższy
alkanol, np. etanol albo zwłaszcza metanol albo w

mieszanie alkoholu z innym rozpuszczalnikiem organicznym, w którym peptyd jest rozpuszczalny, takim jak, octan etylu, dwumetyloformamid, chlorek metylenu albo lodowaty kwas octowy. Reakcję prowadzi się celowo przy stałym nadmiarze jodu, np. w roztworze rozcieńczonym, przy wprowadzeniu roztworu peptydu do roztworu jodu. W ten sposób otrzymuje się wyłącznie żądany monomer. Natomiast przy odwrotnym postępowaniu, tj. np. wkraplaniu roztworu jodu do roztworu peptydu, otrzymuje się znaczną ilość polimeru. Z otrzymanego roztworu nadmiar jodu można usunąć, np. tiosiarczanem.

Grupy cysteinowe chronione grupami tritylowymi po odszczepieniu grup tritylowych i utworzeniu mostka dwusiarczkowego przeprowadza się bezpośrednio w grupy cystynowe.

W reakcji tej jako produkty wyjściowe stosuje się peptydy, w których wolne grupy aminowe zostały celowo zabezpieczone. W razie potrzeby można również zabezpieczać wolne grupy wodorotlenowe i karboksylowe. Jako grupy ochronne dla grupy aminowej można stosować np. grupę benzylową, trójfluorometylową, ftaliilową, p-toluenosulfonylową albo przede wszystkim grupy wywodzące się z kwasu węglowego, jak ewentualnie grupy karbobenzoksyłowe podstawione w reszcie aromatycznej atomami chlorowca, grupami niskoalkilowymi, albo niskoalkoksyłowymi lub niskokarboalkoksyłowymi, barwnik grupy benzylooksykarbonylowe, jak p-fenylazobenzylooksykarbonyl i p-/p'-metoksy-fenylazo/benzylooksykarbonyl, tolilooksykarbonyl, 2-fenylizopropyllooksykarbonyl, 2-tolilizopropyllooksykarbonyl, a przede wszystkim 2-p-dwufenylizopropyllooksykarbonyl, /francuski opis patentowy nr 1 554 051/, następnie alifatyczne grupy oksykarbonylowe, jak np. alililoksykarbonyl, cyklopentyliloksykarbonyl, trzeciorzędowy anylooksykarbonyl, adamantyliloksykarbonyl i przede wszystkim trzeciorzędowy butyliloksykarbonyl.

Grupy karboksylowe można ewentualnie zabezpieczyć np. przez amidowanie albo przez estryfikację. Jako estry można wymienić np. metanolo-we, etanolowe, estry benzylowe, p-metoksybenzylowe, estry 2,4,5-trójklorofenolu, estry N-hydroksyimidu kwasu bursztynowego, N-hydroksyftaloimidu, albo przede wszystkim estry III-rzęd. butanolu. Grupy wodorotlenowe np. seryny albo tyrozyny można zabezpieczać, np. przez estryfikację, np. alkoholem benzylowym albo korzystnie III-rzęd. butanolem. W resztach argininy grupa gwanidynowa może być zabezpieczona, np. grupą tozylową. Te peptydy dwusiarczkowe wytworzone sposobem według wynalazku, które zawierają grupy ochronne można stosować bezpośrednio do syntezy peptydów o dłuższym łańcuchu aminokwasowym albo, jeśli to jest pożądane, można grupy ochronne odszczepiać w znany sposób za pomocą hydrolizy lub wodorolizy.

Peptydy zawierające cysteinę albo ich pochodne są znane albo też można je wytwarzać znanymi metodami. Nazwa „pochodne peptydów” oznacza w szczególności w których grupy funkcyjne, np. jak np. grupy aminowe, karboksylowe, wodorotlenowe,

zaopatrzone zostały w wyżej wymienione ulb inne stosowane w syntezie peptydów grupy ochronne, dalej związki zawierające zamiast jednej lub obu przeznaczonych do połączenia reszt cysteinowych — reszty dezaminocysteinowe.

Wynalazek ilustrują ale nie ograniczają niżej podane przykłady, w których temperaturę podano w stopniach Celsjusza. W chromatografii cienkowarstwowej stosowano następujące układy:

10 Układ 43C: trzeciorzędowy alkohol amyłowy — izopropanol-woda /100:40:10/

Układ 43C: trzeciorzędowy alkohol amyłowy, izopropanol-woda /51:21:28/

15 Układ 45: trzeciorzędowy butanol — 3%-owy wodny roztwór amoniaku /70:30/

Układ 52: n-butanol — lodowaty kwas octowy — woda /75:7,5:21/

Układ 53: n-butanol — kwas mrówkowy — woda /60:0,75:39/

20 Układ 70: octan etylu — pirydyna — woda /40:20:40/

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

25 Układ 102B: octan etylu — metyloetyloketon — lodowaty kwas octowy — woda /50:30:10:10/

Układ 121A: izopropanol — amoniak /26%/ — woda /85:5:10/

30 W dalszym ciągu opisu stosuje się następujące skróty: BOC oznacza trzeciorzędowy butyliloksykarbonyl. TRI oznacza trityl. W przykładzie I opisano wytwarzanie zabezpieczonego N-końcowego fragmentu o sekwencji 1—9 tyrokalcytoniny z pierścieniem dwusiarczkowym, przykłady II i VIII przedstawiają sposób wytwarzania wiązania dwusiarczkowego między zabezpieczonym fragmentem o sekwencji 20—21 łańcucha A i zabezpieczonym fragmentem o sekwencji 18—21 łańcucha B insuliny. Przykłady III, VII i IX podają wytwarzanie 40 zabezpieczonych dimerów peptydowych z mostkiem dwusiarczkowym; w przykładach IV—VI opisano wytwarzanie nowym sposobem oksytocyny, Lys⁸-wazopresyny i Ph²-, Lys⁸-wazopresyny.

45 Przykład I. Sposób wytwarzania peptydu o wzorze 1. Do roztworu 3,73 g /14,78 mM/ jodu w 500 ml metanolu w czasie mieszania w temperaturze pokojowej wkrapla się w ciągu 45 minut, 2,50 g /1,478 mM/ BOC-Cys/TRI/-Ser-/tBu/-Asn-Leu-Ser-
50 -/tBu/-Thr/tBu/-Cys/TRI/-Val-Leu-OH w 50 ml metanolu. Po skończonym wkraplaniu miesza się dalej w ciągu godziny i odbarwia roztwór w temperaturze 0° 26,05 ml wodnego 1 n roztworu tiosiarczanu. Przezroczysty roztwór zagęszcza się w temperaturze 30° do objętości około 100 ml pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym dodaje 1,5 litra wody, wytrącony produkt odsąca i przemycza wodą. Po wysuszeniu ponad stałym wodorotlenkiem potasowym surowy produkt waży 2,32 g. Produkt ten uciera się dwukrotnie z eterem naftowym i w celu oczyszczenia poddaje rozdzielowi przeciwpądowemu w układzie metanol-bufor-chloroform-czterochlorek 60 węgla /10:3:5:4/. [Jako bufor stosuje się 28,6 ml lodowatego kwasu octowego, 19,25 g octanu amonowego, dopełnione wodą do 1 litra]. Po 135 prze-
65

niesieniach produkt główny znajduje się we frakcjach 39–68 / $T_{\max}=53$, $K=0,65$ /. Frakcje te odparowuje się łącznie w wysokiej próżni do suchości i usuwa octan za pomocą sublimacji. Otrzymuje się 1,49 g peptydu o wzorze 1 co stanowi 83% wydajności teoretycznej. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym wykazuje jednorodność wytworzonego produktu $R_{f_{45}}=0,42$; $R_{f_{121A}}=0,70$; $R_{f_{70}}=0,75$; $R_{f_{53}}=0,43$; $R_{f_{43A}}=0,22$ / $\alpha/D^{23}=-16$ / $c=2$ w chloroformie/. Zabezpieczony nonapeptyd, użyty jako produkt wyjściowy, można również wytwarzać sposobem podanym poniżej:

1/ H-Thr/tBu/-OMe. 12,92 g /40 mM/ Z-Thr/tBu/-OMe w 200 ml lodowatego kwasu octowego uwodornia się w temperaturze pokojowej wobec 3 g 10% palladu osadzonego na węglu. Pochłanianie wodoru zostaje zakończone po upływie 1 godziny. Roztwór odsącza się od katalizatora i odparowuje w temperaturze 35°C pod zmniejszonym ciśnieniem. Po wysuszeniu w wysokiej próżni w temperaturze 35°C otrzymuje się 7,3 g oleju. Chromatogram cienkowarstwowy wykazuje jednorodność otrzymanego produktu. Produkt ten bezpośrednio stosuje się do dalszych reakcji.

2/ DPC-Ser/tBu/-Thr/tBu/-OMe. 19,3 g /38,6 mM/ soli cykloheksyloaminowej DPC-Ser /tBu/-OH, rozpuszcza się w 500 ml chloroformu i w temperaturze 0°C trzykrotnie wytrząsa się z 25 ml 1-n kwasu cytrynowego i pięciokrotnie z 40 ml półnasyconego roztworu soli kuchennej. Roztwór suszy siarczanem sodowym a następnie odparowuje przy czym otrzymaną pianę zalewa 250 ml octanu etylowego. Dodaje się 5,36 ml /38,6 mM/ trójetiloaminy, roztwór oziębia do -10°C i mieszając zadaje go 5,13 ml /38,6 mM/ chlorowęgla izobutyłowego. Miesza się w ciągu 10 minut w temperaturze -10°C i następnie wkrapla oziębiony do -12°C roztwór 7,3 g /38,6 mM/ H-Thr/tBu/-OMe w 100 ml octanu etylu w taki sposób, żeby temperatura podczas reakcji ani na chwilę nie wzrosła ponad -10°C. Po skończonym wkraplaniu miesza się jeszcze w ciągu godziny w temperaturze -10°C, a następnie w temperaturze pokojowej pozostawia na noc. Roztwór odsącza się od wydzielonego chlorowodoru trójetiloaminy, po czym w temperaturze 0°C przemycia się go trzykrotnie 20 ml porcjami 1-n kwasu cytrynowego i pięciokrotnie, nasyconym roztworem chlorku sodowego, suszy i odparowuje. Otrzymuje się 22,07 g produktu surowego w postaci oleju. W celu oczyszczenia, 1 g otrzymanego oleju chromatografuje się na kolumnie o wymiarze 2,5 cm $\times$ 30 cm wypełnionej żel krzemionkowym. Do eluowania stosuje się mieszaninę: eter naftowy — octan etylu /1:1/, po odcieku wstępnym o objętości 110 ml eluuje się 787 mg produktu czystego. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie toluen — aceton /7:3/ wykazuje R_f 0,51.

3/ Z-Val-Leu-OMe. 19,9 g /110 mM/ chlorowodoru H-Leu-OMe rozpuszcza się w 120 ml dwumetyloformamidu i do otrzymanego roztworu w temperaturze 0°C dodaje się 14,6 ml /105 mM/ trójetiloaminy. Wydzielony chlorowodorek trójetiloaminy odsącza się, przesącz wprowadza do roztworu 25,1 g /100 mM/ Z-Val-OH w 200 ml dwumetyloformamidu /0°C/, po czym do otrzymanego roztwo-

ru dodaje się 22,6 g /110 mM/ suchego dwucykloheksylokarbodwuimidu. Po mieszanii w ciągu 1 godziny w temperaturze 0°C i pozostawieniu przez noc w chłodni sącza się i przesącz odparowuje w wysokiej próżni w temperaturze 40°C. Oleistą pozostałość rozpuszcza się w 30 ml octanu etylowego roztwór oziębia do 0°C i odsącza od wydzielonego dwucykloheksylo mocznika. Po dodaniu n-heksanu produkt krystalizuje z przesączu w ciągu kilku nastu godzin. Otrzymuje się produkt o temperaturze topnienia 102–105°C / $\alpha/p^{20}=-41^\circ$ / $c=2,88$ w metanolu/. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie chloroform — metanol /98:2/ wykazuje $R_f=0,55$; a w układzie toluen — aceton /7:3/; $R_f=0,60$.

4/ DPC-Ser/tBu/-Thr/tBu/-NH-NH₂. 4,253 g /7,4 mM/ DPC-Ser/tBu/-Thr/tBu/-OMe w 18 ml metanolu zadaje się 5,55 ml /około 110 mM/ wodzanu hydrazyny i pozostawia na okres 10 godzin w temperaturze pokojowej, po czym w ciągu 2 godzin utrzymuje się w temperaturze 40°C. Następnie mieszaninę reakcyjną zalewa się 450 ml octanu etylowego i czterokrotnie przemycia półnasyconym roztworem soli kuchennej, suszy siarczanem sodowym, zagęszcza do objętości około 15 ml i zadaje około 5 ml eteru naftowego. W ciągu kilkunastu godzin wykrystalizowuje 3,17 g hydrazynu o temperaturze topnienia 132–134°C.

Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie toluen — aceton /7:3/ wykazuje $R_f=0,40$.

5/ Chlorowodorek H-Val-Leu-OMe. 5,66 g /15 mM/ Z-Val-Leu-OMe uwodornia się w temperaturze pokojowej w 75 ml metanolu w obecności 15 mM kwasu solnego i 850 mg palladu osadzonego na węglu /10%/. Pochłanianie wodoru ustaje po upływie 3 godzin. Roztwór odsącza się od katalizatora i przesącz zagęszcza do objętości około 15 ml. W wyniku dodania eteru produkt wydziela się w postaci krystalicznej. Temperatura topnienia 136–139°C. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie chloroform — metanol /9:1/ wykazuje $R_f=0,45$; w układzie toluen — aceton /1:1/ $R_f=0,43$.

6/ TRI-Cys/TRI/-Val-Leu-OMe. 7,13 g /10 mM/ soli dwuetyloaminowej TRI-Cys/TRI/-OH w chloroformie w temperaturze 0°C przemycia się 1-n kwasem cytrynowym i półnasyconym roztworem soli kuchennej. Przemity roztwór suszy, odparowuje, a wytworzoną pianę rozpuszcza w 50 ml octanu etylowego. W międzyczasie przygotowuje się roztwór 3,22 g /10 mM/ chlorowodoru H-Val-Leu-OMe w 40 ml octanu etylowego, roztwór ten zadaje się 1,4 ml /10 mM/ trójetiloaminy, odsącza wydzielony chlorowodorek trójetiloaminy, a przesącz w temperaturze 0°C wprowadza do powyżej sporządzonego roztworu octanowego zawierającego drugi fragment peptydu. Następnie do mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 0°C dodaje się 2,26 g /11 mM/ suchego dwucykloheksylokarbodwuimidu, miesza w ciągu 2,5 godziny w temperaturze 0°C i pozostawia na okres kilkunastu godzin w chłodni. Wydzielony dwucykloheksylo mocznik odsącza się, przesącz przemycia w temperaturze 0°C 1 n kwasem cytrynowym, 1 n wodorowęgla sodu i pół-

nasyconym roztworem soli kuchennej, po czym suszy siarczanem sodu. Roztwór zagęszcza się do objętości około 20 ml, oziębia do 0°C i odsąca od dalszych ilości wydzielonego dwucykloheksylomocznika. Po odparowaniu do sucha otrzymuje się 8,53 g estru. W celu oczyszczenia chromatografuje się surowy produkt na kolumnie /5 cm; 55 cm/ wypełnionej żelą krzemionkowym. Po odcieku wstępnym 400 ml produkt główny eluuje się w stanie czystym 300 ml układu eter naftowy — octan etylu /1:1/, chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie chloroform — metanol /99:1/ wykazuje $R_f=0,43$.

7/ H-Cys/TRI/-Val-Leu-OMe. 11,08 g /13,3 mM/ TRI-Cys/TRI/-Val-Leu-OMe rozpuszcza się w 75 ml octanu etylowego i do otrzymanego roztworu wkrapla 12,3 ml wody, w ten sposób aby roztwór był stale przezroczysty. Po mieszaniu w ciągu 1 godziny w temperaturze pokojowej do przezroczystego roztworu dodaje się 64 ml wody, osad odsąca i przemywa zimnym 50% kwasem octowym. Przesącz zagęszcza się w wysokiej próżni w temperaturze 40°C do postaci oleju, który rozpuszcza się w 250 ml octanu etylowego i w temperaturze 0°C przemywa roztworem 1 n wodorowęglanu sodowego i nasyconym roztworem soli kuchennej. Po wysuszeniu siarczanem sodowym rozpuszczalnik odparowuje się, otrzymując 7,07 g białego produktu. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie chloroform — metanol /98:2/ przy spryskaniu odczynnikami Reindel-Hoppego wykazuje plamę o wartości $R_f=0,30$.

8/ DPC-Ser/tBu/-Thr/tBu/-Cys/TRI/-Val-Leu-OMe. Do 13,6 g /23,8 mM/ DPC-Ser/tBu/-Thr/tBu/-NH₂ w 220 ml dwumetyloformamidu dodaje się w temperaturze —12°C 32,26 ml kwasu solnego w octanie etylowym /1,84-n, 59,25 mM/ i 3,26 ml /28,55 mM/ trzeciorzędowego butylowego azotynu. Po upływie 15 minut w temperaturze —10°C dodaje się oziębiony do —10°C roztwór 14,03 g /23,8 mM/ H-Cys/TRI/-Val-Leu-OMe i 8,315 ml /59,25 mM/ trójetiloaminy w 100 ml dwumetyloformamidu w taki sposób żeby temperatura mieszaniny reakcyjnej ani przez chwilę nie przekraczała —9°C. Następnie miesza się jeszcze w ciągu godziny w temperaturze —10°C, po czym pozostawia się na okres kilkunastu godzin w temperaturze pokojowej. Wydzielony chlorowodorek trójetiloaminy odsąca się, przesącz zagęszcza w wysokiej próżni w temperaturze 40°C, a oleistą pozostałość rozpuszcza w 500 ml octanu etylowego, przemywa 1 n kwasem cytrynowym, 1 n wodorowęglanem sodowym i nasyconym roztworem soli kuchennej, suszy, zagęszcza do objętości około 40 ml i zadaje około 10 ml eteru naftowego. W ciągu kilkunastu godzin wykrystalizowuje zabezpieczony ester pentapeptydu o temperaturze topnienia 177—178°C.

Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie chloroform — metanol /98:2/ wykazuje $R_f=0,45$, w układzie toluen — aceton /7:3/ $R_f=0,57$.

9/ DPC-Ser/tBu/-Thr/tBu/-Cys/TRI/-Val-Leu-OH. 2,830 g /2 mM/ DPC-Ser/tBu/-Thr/tBu/-Cys/TRI/-Val-Leu-OMe rozpuszcza się 60 ml 75% dwuoksa-

nu i zadaje 3 ml /6 mM/ 2 n ługu sodowego. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się 1,5 godziny w temperaturze pokojowej, po czym oddestylowuje dwuoksan pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C, dodaje octanu etylowego i wody i w temperaturze 0°C za pomocą 1 n kwasu cytrynowego doprowadza się pH do wartości 3. Ekstrakt octanowy przemywa się roztworem soli kuchennej, suszy i odparowuje.

Chromatogram na żelu krzemionkowym wykazuje jednorodność otrzymanego produktu, R_f w układzie chloroform-metanol /7:3/ = 0,40; $R_f=45$, $R_f=0,55$.

10/ H-Ser/tBu/-Thr/tBu/-Cys/TRI/-Val-Leu-OH. 2,22 g /2 mM/ DPC-Ser/tBu/-Thr/tBu/-Cys/TRI/-Val-Leu-OH rozpuszcza się w 20 ml chlorku metylenu i dodaje 12 ml wodnego roztworu kwasu chlorooctowego /75 g kwasu chlorooctowego i 25 ml wody/. Przezroczysty roztwór miesza się w ciągu 15 minut w temperaturze pokojowej, oziębia do 0°C i zadaje 70 ml wody. Stężonym roztworem amoniaku doprowadza się pH roztworu do wartości 6,5 przy czym następuje wytrącenie produktu. Dekantuje się wodny roztwór, a pozostałość rozciera trzykrotnie z wodą i następnie liofilizuje. Po trzykrotnym rozcieńczeniu produktu z eterem otrzymuje się bezbarwny proszek. Chromatogram cienkowarstwowy wskazuje na jednorodność wytworzonego produktu. W tej postaci produkt stosuje się do dalszej syntezy.

Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym $R_{f45}=0,48$, $R_{f101}=0,65$, $R_{f52}=0,75$.

11/ Z-Asn-leu-OMe. 16,7 g H-Leu-OMe i 46,0 g Z-Asn-ONP rozpuszcza się w 100 ml świeżo przedestylowanego dwumetyloformamidu. Roztwór pozostawia się na okres 19 godzin w temperaturze 25°C. Następnie dodaje 1,2 litra wody i krystaliczny osad odsąca na nuczyci. Pochodną dwupeptydu suszy się w temperaturze 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem a następnie krystalizuje się dwukrotnie z mieszaniny metanolu z wodą. Otrzymuje się produkt o temperaturze topnienia 180—181°C $[\alpha]_D^{20} = +9^\circ/c = 2,05$ w chloroformie/.

12/ H-Asn-Leu-OMe 15,0 g Z-Asn-OMe rozpuszcza się w 400 ml mieszaniny trzeciorzędowej butanolu i wody /9:1/ i uwodornia się w obecności 2 g palladu osadzonego na węglu /10% Pd/. Po skończonym wodorowaniu katalizator odsąca się na nuczyci i odparowuje przesącz w temperaturze 40°C. Pozostałość stosuje się bezpośrednio do dalszej syntezy.

13/ Z-Ser⁴/tBu/-Asn-Leu-OMe. 8,90 g H-Asn-Leu-OMe i 11,0 g Z-Ser/tBu/-OH rozpuszcza się w 100 ml świeżo przedestylowanego dwumetyloformamidu. Do oziębionego do temperatury 0°C roztworu wprowadza się 3,90 g N-hydroksysuksynoimidu, a następnie 8,70 dwucykloheksylokarbodiimidu. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się w ciągu 30 minut w temperaturze 0°C a następnie 18 godzin w temperaturze 25°C, po czym wydzielony dwucykloheksylomocznik odsąca się na nuczyci i przesącz wylewa do 800 ml wody z lodem. Wypadający przy tym krystaliczny osad suszy pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C, a następnie przekrystalizowuje z mieszaniny metanolu z wodą. Otrzymany w ten sposób Z-Ser/tBu/-Asn-Leu-OMe o

analitycznym stopniu czystości topnieje w temperaturze 202–205°C, $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ /c=1,05 w lodowatym kwasie octowym/.

14/ H-Ser/tBu/-Asn-leu-OMe, 6,3 g Z-Ser/tBu/-Asn-Leu-OMe rozpuszcza się w 600 ml metanolu i uwodornia w obecności 1,2 g palladu osadzonego na węglu /10% Pd/. Po upływie 1,25 godziny odsąca się katalizator na nucz i przesącz pod zmniejszonym ciśnieniem odparowuje się do sucha w kąpeli 30°. Otrzymuje się krystaliczną pochodną trójpetydu której chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie chloroform — metanol /90:10/ wykazuje $R_f = 0,11$.

15/ BOC-Cys/TRI/-Ser/tBu/-Asn-Leu-OMe, 5,0 g H-Ser/tBu/-Asn-Leu-OMe i 6,7 g BOC-Cys/TRI/-ONP rozpuszcza się w 30 ml świeżo przedestylowanego dwumetyloformamidu, żółty roztwór pozostawia się w spokoju w ciągu 42 godzin w temperaturze 26°C następnie dodaje 500 ml wody z lodem i odsąca wytrącony produkt. Produkt ten rozpuszcza się w octanie etylu przemywa się roztwór 5% roztworem kwasu cytrynowego i wodą. Następnie w celu usunięcia p-nitrofenolu, roztwór octanowy przemywa się pięć razy mieszaniną 1 części objętościowej 5% roztworu węglanu potasowego z i częścią objętościową 5% roztworu wodorowęglanu potasowego a następnie wodą. Po wysuszeniu ekstraktu octanowego, rozpuszczalnik odparowuje się otrzymując żywcowaty produkt, który oczyszcza się przez 4 krotnie rozpuszczenie w acetonie i wytrącenie eterem naftowym. Pochodna czteroptydu otrzymana przy tym w postaci stałego proszku wykazuje temperaturę topnienia 181–182°C, $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$ /c=2,09 w metanolu/. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym R_{f43A} wynosi 0,57; R_f w octanie etylu 0,10; R_f w mieszaninie toluenu — aceton /7:3/=0,05; R_f w mieszaninie chloroform — metanol /9:1/=0,45.

16/ BOC-Cys/TRI/-Ser/tBu/-Asn-Leu-NH-NH₂, 7,0 g BOC-Cys/TRI/-Ser/tBu/-Asn-Leu-OMe rozpuszcza się w 70 ml metanolu i roztwór oziębiony do 0°C, zadaje się 7 mililitrami wodzianu hydrazyny. Po upływie 16 godzin w temperaturze 2°C dodaje się 600 ml lodowato zimnego roztworu 2 n kwasu octowego, galaretowaty osad dobrze się rozciera, odsąca na nucz i przemywa dużą ilością wody aż do obojętnego odczynu przesącza. Otrzymany proszek suszy się w temperaturze 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie zawiesza się w 100 ml acetonitrylu. Po roztarciu odsąca się na nucz i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C. Otrzymany hydrazyd BOC-Cys/TRI/-Ser/tBu/-Asn-Leu wykazuje temperaturę topnienia 216–218°C.

Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym wykazuje następujące wartości R_f : $R_f = 0,55$ w mieszaninie dwuoksan — woda /98:2/; $R_f = 0,52$ w mieszaninie chloroform-metanol /8:2/ $R_{f102E} = 0,70$.

17/ BOC-Cys/TRI/-Ser/tBu/-Asn-Leu-Ser/tBu/-Thr/tBu/-Cys/TRI/-Val-Leu-OH. Do 1,075 g /1,26 mM/ BOC-Cys/TRI/-Ser/tBu/-Asn-Leu-NH-NH₂ w 15 ml dwumetyloformamidu dodaje się w temperaturze —15°C 1,71 ml kwasu solnego w octanie

etylu /1,84 n, 3,15 mM/ i 0,174 ml /1,51 mM/ azotynu trzeciorzędowego butylu /z roztworu 1 ml azotynu trzeciorzędowego butylu dopełnionego do 10 ml dwumetyloformamidem/. Do roztworu mieszanego w ciągu 15 minut w temperaturze —10°C, wkrapla się oziębiony do —12°C roztwór złożony z 1,104 g /1,26 mM/ H-Ser/tBu/-Thr/tBu/-Cys/TRI/-Val-Leu-OH i 0,61 ml /4,41 milimoli/ trójetyloaminy w 15 ml dwumetyloformamidu. Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu godziny w temperaturze —10°C, a następnie w ciągu 4 godzin w temperaturze pokojowej. Po zagęszczeniu roztworu do małej objętości w wysokiej próżni i dodaniu wody otrzymuje się produkt w postaci proszku, który dwukrotnie rozciera się z wodą, a potem suszy w wysokiej próżni stałym wodorotlenkiem potasowym. Produkt surowy oczyszcza się przez rozpuszczenie i wydzielenie z metanolu. Z metanolowego roztworu nasyconego w temperaturze 50°C, wydziela się, w ciągu kilkunastu godzin, w temperaturze 0°C biały proszek jednorodny w chromatogramie cienkowarstwowym.

Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym $R_{f43C} = 0,54$; $R_{f121A} = 0,65$; $R_{f45} = 0,50$; $R_{f70} = 0,75$; R_f w mieszaninie chloroform — metanol /8:2/=0,40.

Przykład II. Sposób wytwarzania peptydu o wzorze 2. Do 172 mg /0,2 mM/ BOC-Val-Cys/TRI/-GLy-Glu/OtBu₂ i 128 mg BOC-Cys/TRI/-Asn-OtBu w 5 ml octanu etylowego i 2 ml metanolu dodaje się 254 mg /1 mM/ jodu w 5 ml metanolu i pozostawia roztwór w ciągu godziny w temperaturze pokojowej. Następnie w temperaturze 0°C roztwór odbarwia się 1 n roztworem tiosiarczanu, mieszaninę reakcyjną zadaje w 200 ml octanu etylowego i roztwór trzykrotnie przemywa wodą. Podczas zagęszczania wysuszonego siarczanem sodowym roztworu w octanie etylu wytrąca się krystaliczny /BOC-Cys-Asn-OtBu₂ otrzymuje się 32 mg produktu o temperaturze topnienia 194–196°C. Produkt ten odsąca się. Przesącz odparowuje się do sucha i pozostałość uciera z eterem naftowym. nierozpuszczalną pozostałość chromatografuje na kolumnie wypełnionej żel krzemionkowym otrzymując 90 mg związku o wzorze 1. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie chloroform — metanol /95:5/ wykazuje $R_f = 0,25$ a w układzie toluen — aceton /1:1/ $R_f = 0,30$.

Jako drugi produkt w chromatografii kolumnowej otrzymuje się 54 mg /BOC-Val-Cys-Gly-Glu/OtBu₂; R_f /na żelu krzemionkowym/ w układzie chloroform — metanol /9:1/=0,55. Wyżej wymieniony krystaliczny dimer o temperaturze topnienia 194–196°C wykazuje następujące wartości R_f /na żelu krzemionkowym/: w układzie chloroform — metanol /9:1/ $R_f = 0,25$; w układzie toluen — aceton /1:1/ $R_f = 0,18$.

Oba peptydy wyjściowe można wytworzyć, jak niżej:

1/ Z-Asn-OtBu, 32 g /120 mM/ Z-Asn-OH rozpuszcza się 600 ml dwuoksanu i do otrzymanego roztworu wprowadza się w temperaturze —30°C ml izobutyleny. Po dodaniu 12 ml stężonego kwasu siarkowego zamyka się kolbę i wstrząsając od cza-

su do czasu, pozostawia się na okres 20 godzin, w temperaturze 0°C otrzymując w rezultacie klarowny roztwór. Roztwór ten, w temperaturze pokojowej uwalnia się w znacznym stopniu od nadmiaru izobutyleny, a następnie w temperaturze 0°C zadaje się wodnym roztworem 44 g wodorowęglanu potasowego, po czym odparowuje do małej objętości i zalewa octanem etylu. Fazę organiczną przemywa się 1 n roztworem wodorowęglanu, a następnie wodą aż do odczynu obojętnego. Podczas zagęszczania wysuszonego siarczanem sodowym roztworu w octanie etylowym, produkt zaczyna krystalizować. Dodaje się jeszcze n-heksanu i odsąca. Temperatura topnienia produktu 100–102°C. α/D^{25}_{20} : -16° $c=2$ w metanolu/. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie toluen — aceton /7:3/ wykazuje $R_f=0,27$; w octanie etylu $R_f=0,43$.

2/ H-Asn-OtBu. 23,6 g /73,2 mM/ Z-Asn-OtBu w 200 ml octanu etylowego uwodornia się w obecności 2 g palladu osadzonego na węglu /10%/o/. Pochłanianie wodoru ustaje po upływie godziny. Katalizator odsąca się. Podczas zagęszczania przesącza wykrystalizowuje produkt o temperaturze topnienia 96–98°C, α/D^{25}_{20} : +2° $c=2,1$ w metanolu/. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym wykazuje $R_{f_{52}}=0,30$; $R_{f_{45}}=0,50$.

3/ BOC-Cys/TRI/-Asn-OtBu. Do 18,52 g /40 mM/ BOC-Cys/TRI/-OH i 5,6 ml /40 mM/ trójetyloaminy w 200 ml czterohydrofuranu w temperaturze -10°C dodaje się 5,32 g /40 mM/ chlorowęgla izobutyli i miesza w tej temperaturze w ciągu 10 minut. Następnie do otrzymanej mieszaniny reakcyjnej wkrapla się oziębiony do -10°C roztwór 7,52 g /40 mM/ H-Asn-OtBu w 150 ml czterohydrofuranu i pozostawia się mieszaninę w ciągu 1 godziny w temperaturze -10°C, a następnie w ciągu kilkunastu godzin w temperaturze pokojowej. Wydzielony chlorowodorem trójetyloaminy odsąca się, przesącz odparowuje do sucha, pozostałość rozpuszcza w octanie etylu i przemywa roztworem 1 n kwasu cytrynowego, 1 n wodorowęglanu sodowego i wodą. Podczas zagęszczania octanowego roztworu i dodawania doń eteru naftowego produkt wydziela się w postaci krystalicznej. Otrzymuje się produkt o temperaturze topnienia 155–157°C. α/D^{25}_{20} : +34° $c=2,1$ w chloroformie/. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie toluen — aceton /1:1/ wykazuje $R_f=0,45$; w układzie chloroform — metanol /95:5/ $R_f=0,33$; $R_{f_{48A}}=0,65$.

4/ Z-Cly-Glu/OtBu₂. Do roztworu 23,2 g /0,11 M/ Z-Gly-OH i 15,54 ml /0,11 M/ trójetyloaminy w 200 ml czterohydrofuranu w temperaturze -10°C dodaje się 14,97 ml /0,11 M/ chlorowęgla izobutyli i pozostawia w spokoju w ciągu 10 minut w temperaturze 10°C. Mieszaninę 28,52 g /96,5 mM/ chlorowodoru H-Glu/OtBu₂ i 13,5 ml /96,5 mM/ chlorowodoru trójetyloaminy w 300 ml czterohydrofuranu odsąca się od chlorowodoru trójetyloaminy, oziębia przesącz do -10°C i następnie w temperaturze -10°C wkrapla do powyższego roztworu i miesza się jeszcze w ciągu 1 godziny w temperaturze -10°C i w ciągu 2 godzin w temperaturze pokojowej. Wydzielony chlorowodorem trój-

etyloaminy odsąca się i przesącz odparowuje do suchości. Otrzymany olej rozpuszcza się w octanie etylu i przemywa roztwór 1 n roztworem kwasu cytrynowego, 1 n roztworem wodorowęglanu sodu i wodą. Po odparowaniu octanu etylu otrzymuje się pochodną peptydu, krystalizującą z mieszaniny octanu etylowego z n-heksanem. Temperatura topnienia 74–76°C; α/D^{25}_{20} : -17° $c=2,2$ w metanolu/. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie toluen — aceton /7:3/ wykazuje $R_f=0,50$.

5/ H-Gly-Glu/OtBu₂ 2,7 g /6 mM/ w 30 ml octanu etylu uwodornia się w obecności 250 mg palladu osadzonego na węglu /10%/o/. Po upływie 4 godzin pochłanianie wodoru zostaje zakończone. Odsąca się katalizator i odparowuje przesącz. Otrzymuje się produkt w postaci oleju. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym wykazuje jednorodność, przy czym w układzie toluen — aceton /7:3/ $R_f=0,27$; w układzie chloroform — metanol /9:1/ $R_f=0,37$ i $R_{f_{48A}}=0,50$.

6/ TRI-Cys/TRI/-Gly-Glu/OtBu₂. Do 26,6 g /44 mM/ TRI-Cys/TRI/-OH i 13,9 g /44 mmole/ H-Gly-Glu/OtBu₂ w 350 ml octanu etylowego w temperaturze 0°C dodaje się 9,96 g /44 mM/ dwucykloheksylokarbodwumidu, po czym miesza w ciągu 2 godzin w temperaturze 0°C i pozostawia na kilkanaście godzin w chłodni. Następnie odsąca się wydzielony dwucykloheksylomocznik, przesącz przemywa 1 n kwasem cytrynowym, 1 n wodorowęglanem sodu i wodą, roztwór suszy i odparowuje. Produkt krystalizuje się z mieszaniny octanu etylowego z n-heksanem. Temperatura topnienia 107–110°C. α/D^{25}_{20} : +8° $c=2,0$ w metanolu/. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie toluen — aceton /7:3/ $R_f=0,70$; w układzie chloroform — metanol /98:2/ $R_f=0,78$.

7/ H-Cys/TRI/-Gly-Glu/OtBu₂. Do 3,156 g /3,5 mM/ TRI-Cys/TRI/-Gly-Glu/OtBu₂ w 20 ml lodowatego kwasu octowego dodaje się w temperaturze pokojowej 5 ml wody, w ten sposób aby powstający przy tym osad stale rozpuszczał się ponownie. Po upływie około 10 minut występuje zmętnienie i powstawanie osadu. Roztwór miesza się w ciągu 1 godziny, następnie dodaje 15 ml wody i odsąca. Przesącz odparowuje się w wysokiej próżni w temperaturze 40°C, pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu i przemywa w temperaturze 0°C 0,5 n roztworem wodorowęglanu sodowego i wodą. Pianę otrzymaną po odparowaniu rozciera się z eterem naftowym. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie chloroform — metanol /95:5/ wykazuje $R_f=0,40$; w układzie toluen — aceton /1:1/ $R_f=0,55$ i $R_{f_{48A}}=0,60$.

8/ BOC-Val-Cys/TRI/-Gly-Glu/OtBu₂. Do roztworu złożonego z 7,17 g /33 mM/ BOC-Val-OH oraz 4,62 ml /33 mM/ trójetyloaminy w 80 ml octanu etylowego w temperaturze -10°C dodaje się 4,4 ml /33 mM/ chlorowęgla izobutyli i roztwór miesza się w ciągu 10 minut w temperaturze -10°C. Następnie do mieszaniny wkrapla się oziębiony do -10°C roztwór 21,92 g /33 mM/ H-Cys/TRI/-Gly-Glu/OtBu₂ w 400 ml octanu etylu i pozostawia się mieszaninę w ciągu 1 godziny w temperaturze

—10°C oraz w ciągu 10 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie odparowuje się do sucha, pozostałość rozciera dwukrotnie z dwiema kolejnymi 200 ml porcjami wody i suszy nad pięciotlenkiem fosforu. Pozostałość rozpuszcza się w 450 ml gorącego metanolu. Produkt wykrywa się w ciągu kilkunastu godzin w temperaturze 0°C. Temperatura topnienia 213—215°C $\alpha_D^{25} = +19^\circ$; $\eta_{sp}/c = 2,2$ w chloroformie/. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym w układzie cykloheksan — octan etylu /1:1/ wykazuje $R_f = 0,18$; w układzie toluen — aceton /1:1/ $R_f = 0,65$.

Przykład III. 172 mg /0,2 mM/ BOC-Val-Cys/TRI/-Gly-Glu/OtBu₂ w 5 ml octanu etylowego i 2 ml metanolu zadaje się 127 mg /0,5 mM/ jodu w 2,5 ml metanolu i pozostawia mieszaninę reakcyjną w ciągu 1 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie w temperaturze 0°C odbarwia się roztwór 1 n roztworem tiosiarczanu, dolewa 200 ml octanu etylowego i trzykrotnie przemywa roztwór wodą. Po odparowaniu octanu etylowego otrzymany produkt rozciera się dwukrotnie z eterem naftowym. Otrzymuje się nierozpuszczalny w eterze naftowym [BOC-Val-Cys-Gly-Glu/OtBu₂]₂. Chromatogram cienkowarstwowy wykazuje jednorodność. Otrzymuje się 123 mg produktu, co odpowiada 100% wydajności.

Przykład IV. Sposób wytwarzania peptydu o wzorze 3. Do roztworu 620 mg jodu w 150 ml metanolu przy energicznym mieszaniu wkrapla się w temperaturze 25°C w ciągu 45 minut, 500 mg BOC-Cys/TRI/-Tyr/tBu/-Ile-Gln-Asn-Cys/TRI/-Procleu-Gly-BH₂ rozpuszczonego w 100 ml metanolu. Roztwór miesza się jeszcze 1 godzinę, po czym ochładza do 5°C i odbarwia za pomocą dodania 1 n wodnego roztworu tiosiarczanu sodowego. Następnie zagęszcza się roztwór pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości około 5 ml i wytrącony dużą ilością wody produkt odsącza na nuczcy i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem nad wodorotlenkiem sodu. W celu przeprowadzenia w wolną oksytocynę produkt zawieszają w 5 ml lodowato zimnego stężonego kwasu solnego i rozpuszcza podczas mieszania. Po upływie 10 minut roztwór rozcieńcza się 20 ml wody z lodem i po dodaniu 5 ml lodowatego kwasu octowego sączy przez kolumnę słabo zasadowego wymienniacza jonowego Nr II firmy Merck /w postaci octan/ i przemywa 20% kwasem octowym. Następnie przesącz odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 30°C, pozostałość rozpuszcza w wodzie i liofilizuje. Otrzymaną w ten sposób surową oksytocynę można ewentualnie jeszcze oczyścić metodą Yamashiro /Nature 201, 76 /1964/.

Użyta jako produkt wyjściowy zabezpieczoną pochodną nonapeptydu BOC-Cys/TRI/-Tyr/tBu/-Ile-Gln-Asn-Cys/TRI/-Pro-Leu-Gly-NH₂ można wytwarzać według niżej podanego sposobu:

1/ TRI-Cys/TRI/-Pro-Leu-Gly-NH₂. 30 g H-Pro-Leu-Gly-NH₂ rozpuszcza się w 500 ml świeżo przedestylowanego dwumetyloformamidu i do roztworu oziębionego do 5°C wprowadza 70 g TRI-Cys/TRI/-OH, 20 g N-hydroksyimidu kwasu bursztynowego oraz 30 g dwucykloheksylokarbodiimidu. Po upływie 30 minut utrzymywania roztwo-

ru w temperaturze 0°C roztwór ogrzewa się do temperatury pokojowej i pozostawia się w spokoju w ciągu 18 godzin. Następnie wydzielony dwucykloheksylokarbodiimid odsącza się na nuczcy, przesącz odparowuje w wysokiej próżni w temperaturze 40°C i pozostałość zadaje 1 litrem eteru naftowego. Po dokładnym roztarciu nierozpuszczonego produktu w eterze naftowym, eter dekantuje się a pozostałość nie rozpuszczoną w eterze naftowym, rozpuszcza się w octanie etylu, roztwór przemywa w temperaturze 0°C rozcieńczonym roztworem kwasu cytrynowego, wodą, roztworem wodorowęglanu sodowego i wodą, suszy siarczanem sodu i odparowuje do sucha. Otrzymaną przy tym pochodną cztero-peptydu TRI/Cys/TRI/-Pro-Leu-Gly-NH₂ w celu oczyszczenia rozpuszcza się w metanolu i sączy przez kolumnę Sephadex'u LH-20. Otrzymane frakcje odparowuje się i bada ich czystość za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach z żelu krzemionkowego w układzie chloroform — metanol /99:1/. Frakcje czyste łączy się, odparowuje i suszy.

2/ Z-Tyr/tBu/-Ile-Gln-Asn-OH. 4,05 g H-Ile-Gln-Asn-OH rozpuszcza się w 70 ml wody i 1,5 ml trójetyloaminy, po czym do roztworu dodaje 200 ml dwumetyloformamidu a następnie 8 g estru p-nitrofenyloвого Z-Tyr/tBu/, /wytworzonego z Z-Tyr/tBu/-OH i p-nitrofenolu za pomocą dwucykloheksylokarbodiimidu. Temperatura estru 88—89°C po krystalizacji z mieszaniny metanolu z wodą/ i pozostawia w temperaturze pokojowej na okres 72 godzin. Mieszaninę reakcyjną zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C do objętości około 20 ml, następnie dodaje 100 ml 0,5 n roztworu wodorowęglanu sodowego i 200 ml eteru, oddziela roztwór eterowy, a fazę wodną oziębia w lodzie. Po zakwaszeniu 2 n kwasem solnym wydzielony Z-Tyr/tBu/-Ile-Gln-Asn-OH odsącza się na nuczcy i przemywa wodą z lodem. W celu oczyszczenia związek ten jeszcze raz poddaje się wytrąceniu eterem z roztworu w dwumetyloformamidzie.

3/ H-Tyr/tBu/-Ile-Gln-Asn-OH. 1,2 g pochodnej cztero-peptydu otrzymanej według podanego powyżej sposobu /3/ rozpuszcza się w 50 ml 90% kwasu octowego i uwodornia w obecności 0,5 g palladu osadzonego na węglu /10%/ . Po skończonym uwodornianiu odsącza się katalizator, przesącz odparowuje do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość suszy w wysokiej próżni w temperaturze 40°C.

4/ BOC-Cys/TRI/-Tyr/tBu/-Ile-Gln-Asn-OH. Produkt otrzymany według powyższego sposobu /3/ zawieszają w mieszaninie złożonej z 35 ml dwumetyloformamidu i 0,5 ml trójetyloaminy i za pomocą dodania wody przeprowadza do roztworu. Następnie do roztworu wprowadza się 1,0 g estru p-nitrofenyloвого BOC/Cys/TRI/ i pozostawia mieszaninę reakcyjną w spokoju w ciągu 48 godzin w temperaturze 28°C, po czym zagęszcza w wysokiej próżni w temperaturze 35°C, pozostałość zadaje 100 ml lodowato zimnego 1 n kwasu solnego i odsącza na nuczcy surową pochodną pentapeptydu. Po przemyciu wodą z lodem i wysuszeniu produkt poddaje się oczyszczaniu, stosując kilkakrotne roz-

puszczanie w dwumetyloformamidzie i wytrząsanie roztworu eterem. W celu dalszego oczyszczenia produkt rozpuszcza się w metanolu i chromatografuje na kolumnie stosując Sephadex LH-20. 5/ BOC-Cys/TRI/-Tyr/tBu/-Ile-Gln-Asn-Cys/TRI/-Pro-Leu-Gly-NH₂. 2,1 g pochodnej czteroptydu otrzymanej według sposobu 2 i 3,3 g BOC-Cys/TRI/-Tyr/tBu/-Ile-Gln-Asn-OH rozpuszcza się w dwumetyloformamidzie przy dodaniu 1 g N-hydroksyimidu kwasu bursztynowego. Następnie roztwór, oziębiony do temperatury -20°C, zadaje się 0,9 g dwucykloheksylokarbodwuimidu i pozostawia w ciągu 2 godzin w temperaturze -20°C, a następnie w ciągu 48 godzin w temperaturze pokojowej, przy czym po upływie 6, 12 i 18 godzin każdorazowo dodaje się po 200 mg dwucykloheksylokarbodwuimidu. Po odsączeniu wydzielonego dwucyklokarbodwuimidu przesącz zagęszcza się do małej objętości w wysokiej próżni, stosując łaźnię o temperaturze 40°C i dodając eter wytrąca pochodną nonapeptydu. Proszek odsącza się na nuczyci, suszy, rozciera z wodą, znowu odsącza na nuczyci i suszy. Tak otrzymany surowy BOC-Cys/TRI/-Tyr/tBu/-Ile-Gln-Asn-Cys/TRI/-Pro-Leu-Gly-NH₂ w celu oczyszczenia poddaje się przeciwwprądowemu rozdziałowi według sposobu podanego w przykładzie I.

Przykład V. Sposób wytwarzania peptydu o wzorze 4. Do roztworu 1120 mg jodu w 500 ml metanolu utrzymywanego w temperaturze pokojowej wkrapla się w ciągu 45 minut w czasie energicznego mieszania roztwór 800 mg BOC-Cys/TRI/-Tyr/tBu-Phe-Gln-Asn-Cys/TRI/-Pro-Lys/BOC/-Gly-NH₂ w 500 ml metanolu. Mieszaninę reakcyjną oziębia do 2°C, odbarwia się dodając kroplami 1 n wodny roztwór tiosiarczanu sodowego. Następnie roztwór zagęszcza się do małej objętości pod zmniejszonym ciśnieniem, stosując łaźnię o temperaturze 30°C i dużą ilością wody wytrąca produkt. Po odsączeniu na nuczyci, produkt suszy się w eksykatorze próżniowym. W celu przeprowadzenia w Lys⁸ — wazopressynę rozpuszcza się mieszając w 10 ml lodowatego zimnego stężonego kwasu solnego. Po upływie 10 minut rozcieńcza się w temperaturze 0°C 50 ml wody z lodem i dodaje 5 ml lodowatego kwasu octowego. Następnie sączy się przez kolumnę słabo zasadowego /postać octanu/ wymienniczą jonów Nr II firmy Merck i odparowuje eluat do sucha.

Zabezpieczoną pochodną nonapeptydu BOC-Cys/TRI/-Tyr/tBu/-Phe-Gln-Asn-Cys/TRI/-Pro-Lys/BOC/-Gly-NH₂ można wytwarzać w sposób analogiczny do sposobu wytwarzania zabezpieczonego nonapeptydu, opisanego w przykładzie IV, za pomocą kondensacji BOC-Cys/TRI/-Tyr/tBu/-Phe-Gln-Asn-OH z H-Cys/TRI/-Pro-Lys/BOC/-Gly-NH₂ w obecności dwucykloheksylokarbodwuimidu i N-hydroksy-sukcynodwuimidu. W podobny sposób można wytwarzać produkty pośrednie.

Przykład VI. Związek ten można wytworzyć według sposobu podanego w przykładzie V syntetyzując z BOC-Cys/TRI/-Phe-Phe-Gln-Asn-Cys/TRI/-Pro-Lys/BOC/-Gly-NH₂ a następnie wytworzyć mostek otrzymując Phe⁸, Lys⁸-wazopressynę.

Przykład VII. 1,524 g BOC-Cys/TRI/-Gly-Glu/OtBu₂ i 508 mg jodu poddaje się reakcji w 25 ml metanolu w ciągu 1 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór odbarwia się przez wkroplenie wodnego 1 n roztworu tiosiarczanu sodowego w temperaturze 0°C, po czym dodając 50 ml wody wytrąca produkt. Po wysuszeniu surowy produkt trzykrotnie rozciera się z trzema 10 ml porcjami eteru ftalowego. Po przekrystalizowaniu pozostałości z mieszaniny octanu etylowego z eterem naftowym otrzymuje się 945 mg /BOC-Cys-Gly/OtBu₂/ o temperaturze topnienia 150—152°C. Wydajność Rf=0,60 w układzie chloroform — metanol /9:1/.

Przykład VIII. Postępuje się według sposobu podanego w przykładzie VII, stosując 762 mg /1,0 mM/ BOC-Cys/TRI/-Gly-Glu/OtBu₂, 634 mg /1,0 mM/ BOC-Cys/TRI/-Asn-/OtBu/ i 508 mg /2,0 mM/ jodu. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym surowego produktu w układzie chloroform — metanol /9:1/ wykazuje trzy plamy: o Rf=0,60 /BOC-Cys-Gly-Glu/OtBu₂/, związek I/, Rf=0,25 /BOC-Cys-Asn-OtBu₂/, związek II/ i Rf=0,45 odpowiadające związkowi III przedstawionemu wzorem 6.

Produkty wyodrębnia się stosując rozdział przeciwwprądowy w układzie metanol — 0,1 n octan amonu — chloroform — czterochlorek węgla /4:2:1:3/. Po 100 przeniesieniach związek II znajduje się we frakcjach 56—76 /r_{max}=65, K=1,85/. Frakcje te usuwa się, doprowadza nową fazę dolną i przeprowadza dalsze 100 przeniesień. Związek III znajduje się we frakcjach 8—25 /r_{max}=16, K=0,09/, a związek I — we frakcjach 0—5. Z frakcji tych przez odparowanie i odsublimumowanie octanu amonowego otrzymuje się wszystkie trzy związki o stopniu czystości odpowiadający 1 chromatografii cienkowarstwowej. Związek I po przekrystalizowaniu z mieszaniny octanu etylu z eterem naftowym topnieje w temperaturze 150—152°C; wydajność 225 mg /statystyczna 260 mg/, związek II przekrystalizowany z mieszaniny metanolu z eterem wykazuje temperaturę topnienia 194—196°C, wydajność — 162 mg /statystyczna 195 mg/. Związek III jest bezpostaciowy, wydajność 463 mg.

Po przeprowadzeniu reakcji 1 mM BOC-Cys/TRI/-Gly-Glu/OtBu₂ z 2 mM BOC-Cys/TRI/-Asn-OtBu i 3 mM jodu, otrzymuje się 580 mg związku III /statystycznie 606 mg/.

Przykład IX. Do 254 mg /1 mM/ jodu w 5 ml lodowatego kwasu octowego dodaje się roztwór 380 mg /0,5 mM/ BOC-Cys/TRI/-Gly-Glu-/OtBu₂ i 45 mg /0,55 mM/ octanu sodowego /bezwodnego/ w 5 ml lodowatego kwasu octowego i miesza w ciągu godziny w temperaturze pokojowej. Brunatny roztwór odbarwia się za pomocą 1,7 ml 1 n roztworu tiosiarczanu sodowego i liofilizuje. Otrzymany proszek zalewa się wodą, roztwór sączy, a pozostałość na sączku dobrze przemycza wodą. Po wysuszeniu nad pięciotlenkiem fosforu i przekrystalizowaniu z mieszaniny octanu etylu i eterem naftowym otrzymuje się 205 mg /80% /BOC-Cys-Gly-Glu/OtBu₂/ o temperaturze topnienia 151—152°C.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania peptydów zawierających cystynę oraz ich pochodnych, z zawierających cysteinę fragmentów peptydowych, w których grupy merkaptu zabezpieczone są grupami tertylowymi, **znamienny tym**, że fragment peptydu zawierający dwie reszty cysteiny, lub fragmenty peptydowe, z których każdy zawiera resztę cysteiny, traktuje się jodem w rozpuszczalniku organicznym, w którym jod i peptyd przynajmniej częściowo się rozpuszczają.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku alkoholowym.

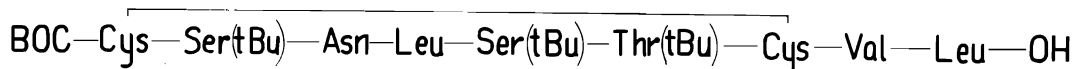
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w niższym alkoholu.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w metanolu.

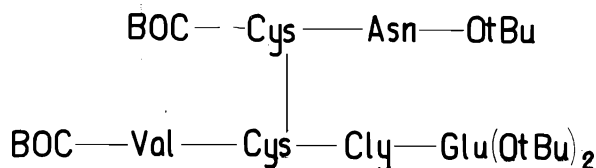
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w lodowatym kwasie octowym.

8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w mieszaninie niższego alkoholu z innym organicznym rozpuszczalnikiem.

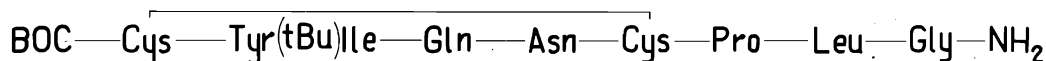
9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w roztworze rozcieńczonym.



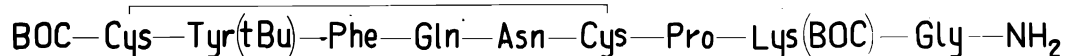
Wzór 1



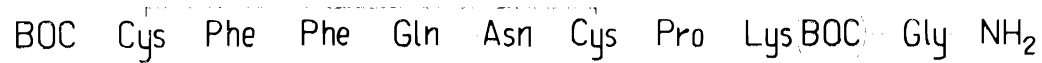
Wzór 2



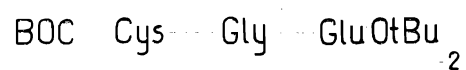
Wzór 3



Wzór 4



Wzór 5



Wzór 6