

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 122483

Int. Cl. C 07 c 103/52 Kl. 12q-6/01

Patentsøknad nr. 3099/68 Inngitt 7.VIII 1968

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 20.II 1969

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 5.VII 1971

Prioritet begjært fra: 19.VIII-67 Tyskland,
nr. F 53291

Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft
vormals Meister Lucius & Brüning,
Postfach 80 03 20, 6230 Frankfurt (Main), 80, Tyskland.

Oppfinner: Erich Wunsch, Midgardstrasse 2a,
Tutzing og Gerhard Wendelberger,
Wilhelm-Kuhnert-Strasse 7, München, Tyskland.

Fullmektig: Bryns Patentkontor A/S.

Fremgangsmåte for fremstilling av glukagon.

Man har hittil ikke kunnet fremstille proteohormonet glukagon syntetisk, men har fremstilt dette stoff av pankreas. En kjemisk fullsyntese av glukagon, insulinets antagonist, er av stor interesse. Syntesen har også stor praktisk betydning, fordi de mengder glukagon som lar seg utvinne av pankreas, er meget små. For terapeutisk anvendelse av glukagon måtte man bearbeide så store mengder pankreas at slike mengder ikke står til disposisjon i praksis. Derfor er en kjemisk glukagon-syntese til tross for de tallrike syntesetrinn fordelaktig i forhold til utvinningen fra pankreas, og betyr et vesentlig teknisk fremskritt.

Man fant nå at glukagon kan fremstilles syntetisk ved at man kondenserer peptidet med glukagon-sekvensen 7 til 29 med formel

122483

2

H-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-

7 8 9 10 11 12

-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp(OtBu)-

13 14 15 16 17 18 19 20 21

-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu (I)

22 23 24 25 26 27 28 29

med et overskudd av et peptid med glukagon-sekvensen 1-6 med formel

AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH (II)

1 2 3 4 5 6

ved hjelp av karbodiimider i nærvær av N-hydroksyraseimid eller N-hydroksyftalimid, og fra det således dannede beskyttede glukagon med formel

AdOC-His-(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-

1 2 3 4 5 6 7 8

-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-

9 10 11 12 13 14 15

-Ser(tBu)-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

-Thr(tBu)(OtBu) (III)

29

avspalter beskyttelsesgruppene ved hjelp av trifluoreddiksyre...

Fremstillingen av de nevnte glukagonpeptider med sekvensene 1-6 samt 7-29, hvilke benyttes som utgangsstoffer, beskrives i det påfølgende i utførelseseksemplene.

Ved kondensasjonen av de to nevnte bruddstykker ifølge oppfinnelsens fremgangsmåte benyttes karbodiimider, fortrinnsvis dicykloheksylkarbodiimid. Kondensasjonsmetoden gjennomføres på vanlig måte. Som oppløsningsmiddel benyttes fortrinnsvis dimetylacetamid, fosforsyre-tri-dimetylamid eller N-metylpyrrolidon eller en blanding av disse oppløsningsmidler. Man begynner ved lave temperaturer på ca. -20 til -10°C og lar reaksjonsblandingen langsomt oppvarmes til værelsestemperatur under omrøring i løpet av reaksjonen. Fra den dannede reaksjonsblanding opparbeides reaksjonsproduktet ved delvis avdestillering av oppløsningsmidlet eller midlene og utfelling med eter/petroleter. De anvendte peptidkomponenter med sekvens 1-6, som er brukt i overskudd, lar seg overraskende ekstrahere selektivt med tetrahydrofuran fra det amorfe reaksjonsprodukt. Denne fordelaktige rensemetode, som vesentlig bidrar til at glukagon-syntesen blir

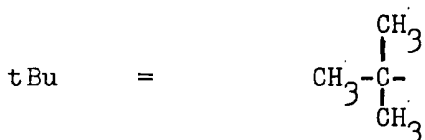
teknisk brukbar, kunne ikke ventes, idet alle andre oppløsningsmidler som anvendes i peptidkjemien viste seg ubrukbare til denne spesielle rensing.

Fremgangsmåtens annet trinn, avspaltingen av beskyttelsesgruppene, skjer ved hjelp av trifluoreddiksyre under vanlige reaksjonsforhold.

Kondensasjonen til syntese av et biologisk aktivt glukagon kan ikke gjennomføres med fritt valgte peptidbruddstykker. F.eks. er det ikke mulig å oppbygge glukagon-sekvensen ved kondensasjon av peptidbruddstykkene 1-8 + 9-29 etter azidmetoden, selv om dette kondensasjonsskjema ifølge de erfaringer som man bygger på i peptidkjemien, syntetiseres spesielt egnet på grunn av serin ved karboksylende-gruppen. Selv ved den valgte kondensasjon ifølge oppfinnelsen ut fra bruddstykkene 1-6 + 7-29 kunne man ikke benytte de kondensasjonsmetoder som ellers er vanlige i peptidkjemien, idet bare den beskrevne kondensasjonsmetode førte til målet.

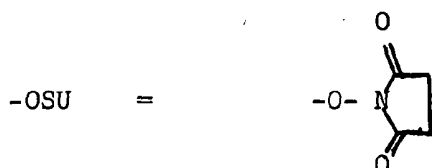
På grunn av glukagonets betydning ved regulering av blod-sukkerinnholdet kan dette peptid finne terapeutisk anvendelse.

I de påfølgende eksempler blir aminosyrene forkortet på vanlig måte. Beskyttelsesgruppene betyr:



122483

4



Peptidets stilling i glukagon-sekvensen angitt i parentes etter forbindelsen.

Eksempel.

a) Beskyttet glukagon (sekvens 1-29):

$\text{Na}, \text{N}(\text{im})$ -Di-adamantylloksykarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyl-glucyl-O-tert.-butyl-L-treonyl-L-fenylalanyl-O-tert.-butyl-L-treonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N-tert.-butyl-oksykarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl-(β -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-L-fenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyl-L-tryptofyl-L-leucyl-L-metionyl-L-asparagyl-O-tert.-butyl-L-treonin-tert.-butylester (1-29).

1,9 g H-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(HBr-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu.HBr (7-29-hydrobromid) og 2,36 g AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH (2-6) og 0,345 g N-hydroksyravsyreimid oppløses i 40 cm³ friskt destillert dimetylacetamid/fosforsyre-tris-dimetylamid (1:1) under omrøring. Den dannede oppløsning tilsettes derpå 0,07 cm³ trietylamin, avkjøles til -15°C, samt omrøres i 24 timer ved 0-5°C etter tilsetning av 0,618 g dicykloheksylkarbodiimid og videre i 3 dager ved romtemperatur. Deretter tilsettes enda 0,6 g AdOC-His(AdOC-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH (1-6), 0,06 g N-hydroksy-ravsyreimid og 0,103 g dicykloheksylkarbodiimid, og blandingen røres videre i to dager. Man oppvarmer i 30 minutter ved 60°C, filtrerer og inndamper dimetylaceta-

midet ved 50°C og 10^{-2} torr, den resterende oppløsning blandes med 1,5 l absolutt dietyleter.

Etter 3 timers henstand frafiltreres bunnfallet som våkes omhyggelig med absolutt dietyleter. Det fremstilte produkt behandles 3 ganger med varm eddikester og derpå 2 ganger med dobbeltdestillert vann, tørkes kort i vakuum og ekstraheres derpå fullstendig ved 17 timers ekstraksjon med absolutt tetrahydrofuran i Soxhlet-apparatur. Etter 15 timers tørking ved 80° og 10^{-2} torr over P_2O_5 fikk man et hvitt amorft pulver.

Utbytte: 2,06 g (84% av teoretisk).

$C_{232}H_{367}N_{43}O_{55}Br_2S + 6H_2O$ (4938,826).

Berettet: C 56,42, H 7,74, N 12,20, O 19,76

Funnet: C 55,91, H 7,39, N 12,31, O 19,61

Aminosyreanalyse:

	His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Asp	Tyr	Lys	Leu
Beregnet:	1	4	3	1	3	2	4	2	1	2
Funnet:	0,87	3,51	3,06	0,98	2,77	1,97	3,97	1,75	0,94	1,95

	Arg.	Ala	Val	Trp	Met	NH_3
Beregnet:	2	1	1	1	1	4
Funnet:	2,0	1,02	1,04	-	0,94	4,50

b) Glukagon (sekvens 1-29)

L-Histidyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycyl-L-treonyl-L-fenyl-alanyl-L-treonyl-L-seryl-L-asparagyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-lysyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl-L-seryl-L-arginyl-L-arginyl-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparagyl-L-fenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyl-L-tryptofyl-L-leucyl-L-metionyl-L-asparagyl-L-treonin (1-29).

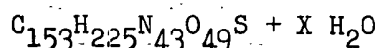
0,5 g AdOC-His(AdOC)-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu (1-29) overhelles med 10 cm³ vannfri trifluorediksyre og henses under argon-atmosfære i 2 timer ved romtemperatur, hvorpå stoffet går i oppløsning. Derpå inndampes trifluorediksyre ved så lav temperatur som mulig (badtemperatur max. 15°C) i vakuum (10^{-2} torr), den gjenværende rest omrøres i 1 time med en vandig oppslemning av Dowex 4 (OH-form) og røres videre i 10 minutter etter surgjøring med eddiksyre til ca. pH = 4. Filtratet fra ionevexleren lyofiliseres, det dannede produkt opptas i iskaldt vann, frafiltreres

122483

6

en liten-mengde uoppløselig stoff og lyofiliseres på nytt, hvorved man sitter tilbake med et hvitt amorft pulver.

Utbytte: 380 mg (rå-glukagon).



Aminosyreanalyse:

	His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Asp	Tyr	Lys	Leu
Beregnet:	1	4	3	1	3	2	4	2	1	2
Funnet	0,85	3,48	2,94	0,99	2,68	1,96	3,90	1,75	0,91	1,92

	Arg	Ala	Val	Trp	Met	NH ₃
Beregnet:	2	1	1	1	1	4
Funnet:	1,99	1,02	1,01	-	0,90	5,02

Fremstilling av utgangspeptidene:

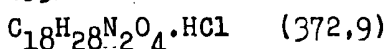
A sekvens-1-6

1) Benzyloksykarbonyl-O-tert.-butyl-L-treonyl-L-fenyl-alanin-metyl-
ester (5-6)

Til en oppløsning av 70 g (226 mmol) Z-Thr(tBu)-OH (5) i 500 cm³ diklormetan tilsettes etter hverandre ved -5°C 31,4 cm³ trietylamin, 29 g (227 mmol) H-P^He-OMeHCl (6-hydroklorid) og 51 g (248 mmol) dicykloheksylkarbodiimid. Reaksjonsblandingen røres i 4 timer ved -5°C og ytterligere 10 timer ved romtemperatur. Filtratet av dicykloheksylurea inndampes i vakuum, residuet fordeles mellom eddik-ester og vann, den fraskilte organiske fase vaskes som vanlig med fortynnet sitronsyre-kaliumhydrogenkarbonat-oppløsning og vann og tørkes over natriumsulfat. Etter inndamping i vakuum får man en olje som tørkes flere timer i høyvakuum. Utbytte 80,0 g (75% av teoretisk).

2) O-tert.-Butyl-L-treonyl-L-fenylalanin-metylester-hydroklorid (5-6)

80,0 g (170 mmol) oljeaktig Z-Thr(tBu)-Phe-OMe (5-6) i 400 cm³ metanol hydreres som vanlig ved tildrypning av n-metanolisk saltsyre ved pH = 4. Filtratet fra katalysatoren inndampes i vakuum, residuet omkrystalliseres fra metanol/dietyleter: smeltepunkt 162-163°C, (α)_D²⁰: +26,6 ± 1° henholdsvis (α)_D²⁰: +33,1° (c = 1,3 i etanol). Kromatografisk rent i tert.-Butanol/iseddik/vann/pyridin (30:6:24:20), henholdsvis tert.-Butanol/iseddik/vann (6:2:2), utbytte 59,1 g (93% av teoretisk).



Beregnet: C 57,98 H 7,84 N 7,51

Funnet: C 57,79 H 7,85 N 7,31

3) Benzylloksykarbonyl-L-glutaminyl-glycinmetylester (3-4)

Til 84,0 g (0,3 mol) Z-Gln-OH (3) og 41,7 g trietylamin i 400 cm³ tetrahydrofuran/acetonitril (1:1) tildryppes langsomt 28,6 cm³ klormaursyreetyler under røring ved -15 C. Til reaksjonsblandingens settes 37,8 g (ca. 0,3 mol) H-Gly-OMe.HCl (4-hydroklorid) og 41,7 cm³ trietylamin i 200 cm³ dimetylformamid, rører en time ved -10  og ytterligere 4 timer ved romtemperatur. Deretter avdestilleres oppløsningsmidlet i vakuum. Residuet behandles med 1000 cm³ 0,5n-HCl, det dannede faste stoffet frafiltreres, behandles derpå med 0,5 n-kaliumhydrogenkarbonat-oppløsning, filtreres på nytt og vaskes godt med vann. Produktet vakuumt rkes over P₂O₅ og omkrystalliseres til slutt fra metanol. Smeltepunkt 174,5 - 175,5 , (α)_D²⁰ : -16,2 $\pm$ 1  henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ : -18,8  (c = 0,8 i etanol), (α)_D²⁰ : -6,6 $\pm$ 1  henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ : -7,7  (C = 1 i iseddik). Utbytte 80,3 g (76% av teoretisk).

C₁₆H₂₁N₃O₆ (351,4)

Beregnet: C 54,70 H 6,02 N 11,96

Funnet: 54,48 H 6,11 N, 11,71

4) L-Glutaminyl-glycin-metylester-hydroklorid (3-4 hydroklorid)

En oppslemning av 88,0 g (235 mmol) Z-Gln-Gly-OMe (3-4) i 400 cm³ metanol hydrogeneres på vanlig måte i n rvar av palladium-svart under tildrypning av n-metanolisk saltsyre ved pH = 4 i 12 timer. Katalysatorblandingens filtrat inndampes i vakuum, og residuet omkrystallisert fra absolutt etanol. Smeltepunkt 110 - 113 , (α)_D²⁰ : +16,6 $\pm$ 1  henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ : +19,3  (c = 2,3 i metanol). Utbytte 56,3 g (94,5% av teoretisk).

C₈H₁₅N₃O₄.HCl (253,7)

Beregnet: C 37,87 H 6,36 N 16,56 Cl 13,98

Funnet: C 37,66 H 6,32 N 16,38 Cl 13,97

5) Benzylloksykarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycinmetylester (2-4)

Til 62,5 g (212 mmol) Z-Ser(tBu)-OH (2) fremstilt ifølge Chem. Ber. 99, 105 (1966), og 29,4 cm³ trietylamin i 400 cm³ tetrahydrofuran tildryppes langsomt og under omrøring ved -10 C 20,2 cm³ klormaursyreetyler, og til den dannede oppløsning av det asymmetriske anhydrid tilsatte man 53,6 g (212 mmol) H-Gln-Gly-OMe.HCl

(3-4-hydroklorid) og 29,4 cm³ trietylamin i 300 cm³ dimetylformamid. Reaksjonsoppløsningen røres i 1 time ved -10°, deretter 2 timer ved romtemperatur hvorefter man inndamper i vakuum. Det dannede residuet behandles med fortynnet sitronsyreoppløsning, det dannede faste produktet filtreres, vaskes inntil syrefritt med vann, tørkes over P₂O₅ i vakuum og omkrystalliseres til slutt fra etanol. Smeltepunkt 185-186°, (α)_D²⁰ : -9,2 ± 0,5° henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ : -10,7° (c = 1,6 i etanol) (α)_D²⁰ : -15,6 ± 1° henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ : -18,9 (c = 1 i 80% eddiksyre), etter tørking ved 90° og 10⁻³ torr kromatografisk rent i n-amylalkohol/pyridin/vann (35:35:30). Utbytte 83,6 g (80% av teoretisk).

C₂₃H₃₄N₄O₈ (494,6)

Beregnet: C 55,86 H 6,93 N 11,33

Funnet: C 55,68 H 7,01 N 11,35

6) Benzyloksykarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycin (2-4)

32,7 g (66 mmol) Z-Ser(tBu)-Gln-Gly-OMe (2-4) i 150 cm³ dioksan forsåpes med 66 cm³ n-natronlut på vanlig måte. Etter surgjøring med 66 cm³ n-svovelsyre inndampes oppløsningen i vakuum til tørrhet, residuet behandles med aceton hvorved natriumsulfat blir tilbake uoppløst. Det i vakuum inndampede filtrat lar tilbake en fast rest som ble omkrystallisert fra en liten mengde vann. Smeltepunkt 158 - 159° (145°), (α)_D²⁰ : -9,0 ± 1° henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ : -10,3° (c = 1,2 i etanol). Kromatografisk rent i tert.-butanol/iseddik/vann/pyridin (30:6:24:20), utbytte 29,2 g (90% av teoretisk).

C₂₂H₃₂N₄O₈ · 1/2 H₂O (489,5)

Beregnet: C 53,98 H 6,80 N 11,43

Funnet: C 54,06 H 6,89 N 11,39

7) Bensyloksykarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycyl-O-tert.-butyl-L-treonyl-L-fenylalanin-metyl-ester (2-6)

Til 42,2 g (88 mmol) Z-Ser(tBu)-Gln-Gly-OH (2-4) og 12,25 cm³ trietylamin i 300 cm³ dimetylformamid tilsettes ved -5° 32,9 g (88 mmol) H-Thr(tBu)-Phe-OMe.HCl (5-6-hydroklorid), 15,2 g (132 mmol) N-hydroksytravsyreimid og 20,0 g (97 mmol) dicykloheksylkarbodiimid. Reaksjonsblandingen røres i 4 timer ved -5° og 14 timer ved romtemperatur, det utfelte dicykloheksylurea frafiltreres og filtratet

inndampes i vakuum. Det dannede residuum blir påfølgende behandlet med 5%ig sitronsyre henholdsvis 10%ig kaliumhydrogenkarbonatopløsning, filtrert og vasket med vann. Etter omkrystallisering fra 70%ig metanol, smeltepunkt $178,5 - 181,5^{\circ}$ (α)_D²⁰ : $+ 5,4 \pm 1^{\circ}$ henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ : $+ 6,5^{\circ}$ ($c = 1,1$ i metanol). Kromatografisk rent i n-heptan/n-butanol/iseddik (3:1:1) henholdsvis n-propanol/iseddik/vann (7:1:2),

Utbytte 65 g (93% av teoretisk).

$C_{40}H_{38}N_6O_{11}$ (798,9)

Beregnet: C 60,13 H 7,32 N 10,52 O 22,03

Funnet: C 60,07 H 7,28 N 10,60 O 21,99

8) Benzyloksykarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycyl-O-tert.-butyl-L-treonyl-L-fenylalanin (2-6)-----

Oppløsningen av 20,0 g (25 mmol) Z-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-Ome (2-6) i 40 cm³ dioksan forsåpes på vanlig måte med 25,5 cm³ n-natronlut i løpet av 30 minutter. Etter surgjøring med 25,5 cm³ n-slatsyre fjernes dioksanet for størstedelen i vakuum, og ved henstand av restoppløsningen ved $+2^{\circ}$ inntrekr krystallisasjonen. Det utfeldte produkt frafiltreres, tørkes i vakuum over P_2O_5 og omkrystalliseres derpå fra etanol/eddikester eller acetonitril. Smeltepunkt $155,5 - 157^{\circ}$, (α)_D²⁰ : $+16,7 \pm 1^{\circ}$, henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ : $+ 19,1$ ($c = 1$ i metanol).

Utbytte 16,3 g (83% av teoretisk)

$C_{39}H_{56}O_{11}$ (784,9)

Beregnet: C 59,68 H 7,19 N 10,71 O 22,42

Funnet: C 59,67 H 7,33 N 10,62 O 22,47

9) O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyl-glycyl-O-tert.-butyl-L-treonyl-fenylalanin (2 - 6)-----

15,7 g (20 mmol) Z-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH (2-6) i 300 cm³ vandig metanol og 1 cm³ eddiksyrer avacyleres på vanlig måte hydrogenolytisk. Katalysatorblandingens filtrat etterlater etter inndamping i vakuum et residuum som krystalliserer ut fra metanol/propanol-2/dietyleter. (α)_D²⁰ : $+ 7,33 \pm 1^{\circ}$ henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ : $+ 9,13^{\circ}$ ($c = 0,9$ i vann). Kromatografisk rent i tert.-butanol/iseddik/vann (4:1:5) henholdsvis amylalkohol/pyridin/vann (35:35:30).

Utbytte 10,85 g (80% av teoretisk).

$C_{31}H_{50}N_6O_9 + 1,5 H_2O$ (677,8).

Beregnet : C 54,96 H 7,86 N 12,41 O 24,7

Funnet: C 54,94 H 8,07 N 12,48 O 25,03

10) N α ,N(im)-Di-adamantylloksykarbonyl-L-histidin-(N-hydroksy-ravsyreimidester) (1)

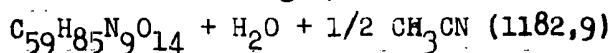
25,6 g AdOC-His(AdOC)-OH (1-3) fremstilt ifølge J.Amer.Chem. Soc 88 (1966), side 1988, og 7 g N-hydroksy-ravsyreimid i 250 cm³ dioksan tilsettes ved 0° 11 g dicykloheksylkarbodiimid. Reaksjonsblandingen omrøres i 2 timer ved 0° og 12 timer ved romtemperatur. Etter fornyet avkjøling til 0° frafiltreres utfelt dicykloheksylurea. Residuet etter inndampning av filtratet i vakuum behandles med 100 cm³ diklormetan, hvorved små mengder dicykloheksylurea forblir uoppløst. Den oppvarmede diklormetan-oppløsning tilsettes forsiktig en liten mengde petroleter. Etter at krystallisasjonen har begynt, helles petroleter forsiktig over og blandingen henses først ved romtemperatur og derpå ved -5° for krystallisasjon. Det frafiltrerte produkt tørkes i vakuum ved 60°. Smeltepunkt 164,5 - 167,5 (151°).

Utbytte 22,6 g.

(Det fremstilte AdOC-His(AdOC)-OSU inneholder fremdeles noe N-hydroksy-ravsyreimid, men er tilstrekkelig rent for den videre omsetning).

11) N,N(im)-Di-adamantylloksykarbonyl-L-histidyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-glutaminyll-glycyl-O-tert.-butyl-L-treonyl-L-fenylalanin (1-6)

6,78 g (1 mmol)-H-Ser(tBu)-Gln-Gly-Thr(tBu)-Phe-OH (2-6) og 1,4 cm³ trietylamin i 150 cm³ pyridin tilsettes ved -5°C 9,2 g (ca. 1,5 mmol) AdOC-His(AdOC)-OSU (1) (roprodukt), reaksjonsoppløsningen røres i 2 timer ved 0° og i ytterligere 8 timer ved romtemperatur, inndampes i vakuum, residuet behandles med absolutt dietyler og filtreres. Produktet oppløst i 100 cm³ metanol tilsettes 500 cm³ vann inneholdende 4,3 g sitronsyre. Den dannede felling frafiltreres, tørkes etter omhyggelig vasking med vann i vakuum og opptas til slutt i 300 cm³ eddikester/metanol (5:1). Deretter tilsettes under omrøring 100 cm³ absolutt dietyler ved langsom inndrypning. Etter flere timers henstand i kjøleskap ved -5°C frafiltreres bunnfallet og dette tørkes ved 40° i vakuum. Ved omkrystallisering fra acetonitril og tørking av fellingen ved 60°C og 10⁻³ torr får man acyl-heksapeptidet inneholdende 1 mol vann og 1/2 mol acetonitril:



Beregnet: C 60,92 H 7,54 N 11,25 O 20,29

Funnet: C 60,88 H 7,61 N 11,24 O 20,09

$(\alpha)_D^{20} : +16,63 \pm 1^\circ$ henholdsvis $(\alpha)_{546}^{20} : +19,94^\circ$ ($c = 0,9$ i metanol).

Kromatografisk rent i amylalkohol/pyridin/vann (35:35:30), n-butanol/iseddik/vann (6:2:2) henholdsvis n-heptan/n-butanol/iseddik (1:2:1).

Utbytte 9,45 g (80% av teoretisk)

$C_{59}H_{85}N_9O_{14} + CH_3OH$ (1176,4)

Beregnet: C 61,26 H 7,63 N 10,72 O 20,40

Funnet: C 60,90 H 7,87 N 10,87 O 20,33

Aminosyreanalyse:

	His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	NH ₃
Beregnet:	1	1	1	1	1	1	1
Funnet:	0,96	0,96	1,0	1,0	1,0	0,96	1,21

B sekvens (7-29)

1) N α -2-nitrofenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-serin-4-nitro-fenylester
 $\text{[NPS-Ser(tBu)-ONP]}$ (8)

Til 50 mmol H-Ser(tBu)-OH i 25 cm³ dioksan og 17 cm³ 2n-natronlut tildryppes under omrøring i løpet av 30 minutter 55 mmol 2-nitro-fenylsulfenylklorid i 25 cm³ dioksan samt 2n-natronlut til en pH-verdi på 8. (Forbruk ca. 38 cm³ 2n-natronlut). Reaksjonsblandingen røres videre i 1 time, filtreres etter fortynning med 600 cm³ vann og surgjøres forsiktig etter tilsetning av 200 cm³ eddikester ved 0°C med n-svovelsyre til pH = 3. Den fraskilte organiske fase vaskes 2 ganger med en liten mengde vann. Til den dannede eddikesteroppløsning av NPS-O-tert.-butyl-serin, tørkes over natriumsulfat, tilsettes ved 0°C og under omrøring 50 mmol 4-nitrofenol og 50 mmol dicykloheksylkarbodiimid. Reaksjonsblandingen omrøres i 1 time ved 0°C samt 3 timer ved romtemperatur, hvorefter utfelt dicykloheksylurea frafiltreres etter kort avkjøling til 0°C, og blandingen inndampes i vakuum. Den gjenværende rest omkrystalliseres fra etanol og tørkes i vakuum over P₂O₅.

Utbytte: 67,5% av teoretisk.

Smeltepunkt 82,5 - 83,5°C

$(\alpha)_D^{20} = -116,0^\circ$ henholdsvis $(\alpha)_{546}^{20} = -130,8^\circ$.

($c = 1$ i dimetylformamid).

$C_{19}H_{21}N_3O_7S$ (435,3)

Beregnet: C 52,43 H 4,86 N 9,65 S 7,35

Funnet: C 52,16 H 4,86 N 9,25 S 7,17

2) L-asparagyl(β -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-

butyl-L-seryl-N_ε-tert.-butyloksykarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-asparaginsyre(β-tert.-butylester) (9-15)-----

200 g (141 mmol) Z-Asp(OtBu)-Tyr-(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH (9-15), fremstilt ifølge Chem.Ber. 99 (1966), side 105, i 2000 cm³ dimetylformamid/95% metanol (1:1) og 3 cm³ iseddik hydrogeneres på vanlig måte ved 40°C i 72 timer. Reaksjonsblandingen oppvarmes på vannbad, katalysatoren frafiltreres og blandingen settes kaldt for krystallisasjon. Det dannede produkt behandles med etanol og tørkes i vakuum. Cromatografisk rent i n-amyllalkohol/pyridin/vann (35:35:30) henholdsvis i n-butanol/iseddik/vann (6:2:2).

Smeltepunkt over 250°, $(\alpha)_D^{20} = +3,5 \pm 1^\circ$ henholdsvis $(\alpha)_{546}^{20} = +4,6$ (c = 1,4 i 80% eddiksyre).

Utbytte 176,4 g (99%).

C₆₆H₁₀₆N₈O₁₇ · 1H₂O (1301,7)

Beregnet: C 60,90 H 8,36 N 8,61

Funnet: D 60,82 H 8,42 N 8,61

Etter tørking ved 90° og 10⁻³ torr kommer man frem til den vannfrie forbindelse.

C₆₆H₁₀₆N₈O₁₇ (1283,6)

Beregnet: C 61,76 H 8,32 N 8,73

Funnet: C 61,78 H 8,40 N 8,73

3) N_α-benzyloksykarbonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N_ε-tert.-butyloksykarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsyre(β-tert.-butyl-ester) (8-15).-----

8,21 g (6,32 mmol) H-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH (9-15) oppløses i 100 cm² dimetylformamid med 0,89 cm³ trietylamin, og tilsettes ved romtemperatur og omrøring 3,42 g (8,2 mmol) Z-Ser(tBu)-ONP (8 g) fremstilt ifølge Chem.Ber. 99 (1966), side 105. Etter 48 timers omrøring tilsettes reaksjonsblandingen 3,8 cm³ iseddik, hvorpå inndampes i vakuum. Den dannede rest behandles med fortynnet sitronsyreoppløsning, filtreres og vaskes først med vann og deretter med dietyleter. Etter omkrystallisering fra 90% metanol og tørking ved 80° og 10⁻³ torr, får man et produkt med smeltepunkt 208-209°C, $(\alpha)_D^{20} = -12,8 \pm 1^\circ$ henholdsvis $(\alpha)_{546}^{20} = -17,5$ (c = 1 i metanol). Kromatografisk rent i amyllalkohol/pyridin/vann (35:35:30) henholdsvis i n-butanol/vann/iseddik (6:2:2). Utbytte 8,75 g (88%).

122483C₈₁H₁₂₅N₉O₂₁ · 1/4 H₂O (1565,5)

Beregnet: C 62,15 H 8,08 N 8,05

Funnet: C 62,06 H 8,11 N 8,01

- 4) O-tert.-butyl-L-seryl-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N_ε-tert.-butyloksykarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsyre(β-tert.-butylester) (8-15)

50 g (32 mmol) Z-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH (8-15) i 800 cm³ dimetylformamid/95% metanol (1:1) og 3 cm³ eddiksyre hydrogeneres ved 45°C som vanlig. Ved kort oppvarming på vannbad bringes det utfelte produkt i oppløsning, hvorefter blandingen frafiltreres katalysatoren mens den ennå er varm, og filtratet henettes derpå flere timer i kjøleskap ved -5°. Det utfelte stoffet frafiltreres, vaskes med vann og tørkes over P₂O₅ i vakuum.

Smeltepunkt 250°, (α)_D²⁰ = -3,9 ± 1° henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ = -4,5°

(c = 1 i 80% eddiksyre). Kromatografisk rent i n-butanol/iseddik/vann (2:2:1) henholdsvis i amylalkohol/pyridin/vann (35:35:30). Utbytte 40,9 g (80%).

C₇₃H₁₁₉N₉O₁₉ · 1H₂O (1444,8)

Beregnet: C 60,69 H 8,44 N 8,73 O 22,10

Funnet: C 60,79 H 8,58 N 8,73 O 21,91

- 5) Na-2-nitro-fenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-treonin(NPS-Thr(tBu)-OH) (7)

7 g (40 mmol) H-Thr(tBu)-OH omsettes med 2-nitro-fenylsulfenylklorid som angitt under B 1) og opparbeides. Den fremstilte eddikesteroppløsning inndampes i vakuum og destilleres azeotropt med benzen, herved inntrekrystallisasjon. Produktet frafiltreres etter behandling med petroleter, vaskes omhyggelig med samme oppløsningsmiddel og tørkes i vakuum. Etter omkrystallisering fra dietyleter/petroleter: Smeltepunkt = 112-114°, (α)_D²⁰ = -93,2 ± 1° henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ = -95,9° (c = 1 i dimetylformamid). Utbytte 12,85 g (nesten kvantativt).

C₁₄H₂₀N₂O₅S (328,4)

Beregnet: C 51,21 H 6,13 N 8,53 S 9,74

Funnet: C 51,25 H 6,07 N 8,46 S 9,74

6) α -2-nitrofenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-treonin-N-hydroksyravsyre-imid-ester (NPS-Thr(tBu)-OSU) (7)

25 mmol NSP-Thr(tBu)-OH i 150 cm³ eddikester tilsettes under omrøring 25 mmol N-hydroksyravsyreimid og 25 mmol dicykloheksylkarbodiimid. Reaksjonsblandingen omrøres videre i 1 time ved 0° og 3 timer ved romtemperatur. Etter frafiltrering av det utfelte dicykloheksylurea inndampes oppløsningen i vakuum, den dannede rest behandles med etanol. Herved går forbindelsen først i oppløsning og derpå inntrer en hurtig krystallisasjon som ved flere timers henstand i kjøleskapet bringes til avslutning. Utbytte 91% av teoretisk. Smeltepunkt 138-139,5°, $(\alpha)_D^{20} = -52,9^\circ$ henholdsvis $(\alpha)_{546}^{20} = -56,9^\circ$ (c = 1 i dimetylformamid)

C₁₈H₂₃N₃O₇S (425,4)

Beregnet: C 50,82 H 5,45 N 9,87 S 7,52

Funnet: C 50,81 H 5,46 N 9,70 S 7,58

7) α -2-nitro-fenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-treonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N-tert.-butyloksy-karbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparaginsyre(β -tert.-butylester)
7-15)

11,6 g (8 mmol) H-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH (8-15) i 150 cm³ dimetylformamid tilsettes 1,12 cm³ trietylamin og 4,2 g (8,8 mmol) NPS-Thr(tBu)-OSU (7)^x, og reaksjonsblandingen røres ved romtemperatur i 15 timer inntil man oppnår en geleaktig stivnet konsistens. Ved behandling av massen med 1000cm³ fortynnet sitronsyreoppløsning (pH=4) utfelles produktet, og blir etter omhyggelig utriving frafiltrert og vasket omhyggelig med vann. Det enda fuktige produktet oppløses i litt varm metanol, og ved henstand av oppløsningen over natten ved 0° utfelles et rent krystallinsk nonapeptid-derivat. Dette frafiltreres og tørkes i vakuum ved 10⁻³ torr. $(\alpha)_D^{20} = -20,8 \pm 1^\circ$ henholdsvis $(\alpha)_{546}^{20} = -23,0^\circ$ (c = 0,9 i dimetylformamid). Kromatografisk rent i amylalkohol/pyridin/vann (35:35:30), kloroform/metanol (7:3) henholdsvis n-butanol/iseddik/vann (6:2:2) henholdsvis n-butanol/etanol/vann (2:2:1).

Utbytte 12,4 g (89%).

C₈₇H₁₃₇N₁₁O₂₃S (1737,2)

Beregnet: C 60,15 H 7,95 N 8,87 S 1,81 O 21,19

Funnet: C 59,94 H 8,05 N 8,58 S 1,94 O 21,43

x fremstilt etter eks. B (6)

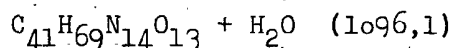
Aminosyreanalyse:

	Thr	Ser	Asp	Tyr	Lys	Leu
Beregnet:	1	2	2	2	1	1
Funnet:	0,95	1,81	2,06	1,85	1,02	1,03

- 8) N α -2-nitro-fenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl-(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginsyre(β -tert.-butylester) (16-21)-----

15,8 g H-Arg(HBr)-Arg-(AcOH)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH (17-21)^x, i 200 cm³ dimetylformamid, tilsettes ved -10°C 10 g NPS-Ser(tBu)-ONP. Reaksjonsoppløsningen røres i 24 timer ved 0° og 40 timer ved romtemperatur, og innrøres derpå i en stor mengde dietyleter. Det utfelte stoff frafiltreres, oppløses i lite dimetylformamid og innrøres på nytt i dietyleter. Denne prosedyre gjentas enda engang, det utfelte stoffet frafiltreres og vaskes omhyggelig med eddikester og dietyleter. Etter 2 gangers omkrystallisering fra metanol/etanol, får man et produkt med dekomponeringspunkt fra 170°C, $(\alpha)_{578}^{20} = -31,1 \pm 1^\circ$ (c = 1 i dimetylformamid). Kromatografisk rent i n-butanol/eddiksyre/vann (6:2:2).

Utbytte 18,4 g (93 % av teoretisk).



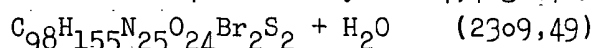
Beregnet: C 44,93 H 6,53 N 17,90 O 20,44 Br 7,29 S 2,93

Funnet: C 44,97 H 6,78 N 17,54 O 20,39 Br 7,05 S 2,88

- 9) N-2-nitro-fenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl-(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-L-fenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyl-L-tryptofyl-L-leucyl-L-metionyl-L-asparaginy-O-tert.-butyl-L-treonin-tert.-butylester (16-29)-----

16,5 g NPS-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg-Ala-Gln-Asp(OtBu)-OH (16-21), 18,5 g H-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu.HBr (22-29-hydrobromid)- fremstilt fra det frie octapeptid (22-29) ifølge Chem.Ber. 100 (1967), side 816 i dimetylformamid ved omsetning med den beregnede mengde 0,1 n-bromhydrogensyre - og 1,73 g N-hydrokxy-ravsyreimid i 300 cm³ dimetylformamid, tilsettes 3,42 g dicykloheksylkarbodiimid ved -15°. Reaksjonsoppløsningen omrøres i 60 timer ved 0° og 24 timer ved romtemperatur. Filtratet etter fraskilling av dicykloheksylurea innrøres i 2000 cm³ eddikester, det dannede bunnfall frafiltreres og omkrystalliseres derpå 2 ganger fra litt metanol/vann. (Den dannede x) fremstilt ifølge Chem.Ber.100 (1967), side 820.

felling fraskilles fortrinnsvis ved sentrifugering). Det således fremstilte produkt blir deretter renset videre ved 3 gangers omkrystallisering fra dimetylformamid/eddikester/vann (200:2500: 20 cm³). Smeltepunkt 230-232° (dekomposisjon, $(\alpha)_D^{20} = -18,83 \pm 1^\circ$ henholdsvis $(\alpha)_{546}^{20} = -20,80^\circ$ (c = 1 i dimetylformamid). Kromatografisk rent i amylalkohol/pyridin/vann (35:35:30) henholdsvis tert.-butanol/eddiksyre/vann/pyridin (60:6:24:20). Utbytte 24,4 g. (70% av teoretisk).



Beregnet: C 50,57 H 6,85 N 15,16 O 17,32 Br 6,92 S 2,78

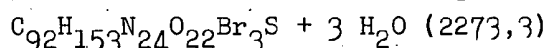
Funnet: C 50,94 H 6,94 N 14,96 O 17,69 Br 6,36 S 2,79

Aminosyreanalyse:

	Ser	Arg	Ala	Glu	Asp	Phe	Val	Leu	Met	Thr	NH ₃
Beregnet:	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	3
Funnet:	0,84	1,98	0,97	2,0	2,01	1,02	1,03	1,04	1,01	0,96	3,26

10) O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydro-bromid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-L-fenyl-alanyl-L-valyl-L-glutaminyl-L-tryptofyl-L-leucyl-L-metionyl-L-asparaginyll-O-tert.-butyl-L-treonin-tert.-butylester-hydrobromid (16-29).

11,5 g NPS-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln-Tro-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu (16-29) og 13,1 g 2-metyllindol i 850 cm³ dimetylformamid/metanol (16:1), tilsettes under isavkjøling dråpevis 110 cm³ 0,1 n-metanolisk bromhydrogensyre. Reaksjonsblandingen røres under videre isavkjøling i 2 timer og derpå 5 timer ved romtemperatur, derpå tilsettes mye absolutt dietyleter. Det utfelte bunnfall frafiltreres og omfelles 2 ganger fra dimetylformamid/metanol/dietyleter under tilsetning av 2-metyllindol. Produktet, som nå er fargelöst, filtreres, vaskes med absolutt dietyleter, og tørkes derpå i vakuum ved 10⁻³ torr. Smeltepunkt 216-218° (Dekomp. $(\alpha)_D^{20} = -34,1 \pm 1^\circ$ henholdsvis $(\alpha)_{546}^{20} = -41,1^\circ$ (c = 1 i 80% eddiksyre). Kromatografisk rent i tert.-butanol/eddiksyre/vann/pyridin (60:6:24:20), kromatogram Whatman Nr. 1, oppadstigende. Utbytte 10 g (90% av teoretisk).



Beregnet: C 48,61 H 7,05 N 14,79 O 17,60 Br 10,55 S 1,47

Funnet: C 48,93 H 7,04 N 14,76 O 17,57 Br 10,51 S 1,46

Aminosyreanalyse:

	Ser	Arg	Ala	Glu	Asp	Phe	Val	Leu	Met	Thr	NH ₃
Beregnet:	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	3
Funnet:	0,89	1,95	1,0	2,02	2,05	1,0	1,01	1,02	0,94	0,96	3,15

11) Na-2-nitrofenylsulfenyl-O-tert.-butyl-L-treonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N₂-tert.-butyloksykarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminy-L-asparagyl(β -tert.-butylester)-L-fenylalanyl-L-valyl-L-glutaminy-L-tryptofyl-L-leucyl-L-metionyl-L-asparaginy-O-tert.-butyl-L-treonin-tert.-butylester (7-29)

7,32 g H-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu-HBr (16-29 og 5,25 g NPS-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-OH (7-15) oppløses i 150 cm³ dimetylacetamid under oppvarming og røring. Blandingen avkjøles til romtemperatur og tilsettes dråpevis 0,42 cm³ trietylamin og derpå 0,52 g N-hydroksyrvasssyreimid, etter avkjøling til -10° og så 0,93 g dicykloheksylkarbodiimid under omrøring. Reaksjonsblandingen holdes i 60 timer ved 0° og ytterligere 40 timer ved romtemperatur under magnetrøring, og inndampes derpå i vakuum ved 10⁻² torr til en seig pasta. Det faste stoff som blir tilbake etter innrøring med dobbeltdestillert vann frafiltreres, suspenderes i litt dimetylacetamid og utfelles på nytt med dobbeltdestillert vann. Produktet blir etter omhyggelig vasking med vann suget tørt og derpå behandlet flere ganger med varm eddikester, filtrert og vasket på nytt med eddikester og dietyleter. Det således fremstilte råprodukt blir derpå, for å fjerne uomsatte komponenter (7-15) ekstrahert 18 timer med absolutt tetrahydrofuran og derpå 9 timer med absolutt metanol i Soxhlet-apparatur. Det således rensede stoff filtreres med dietyleter, og tørkes derpå ved 80° og 10⁻³ torr i 24 timer over P₂O₅. Ved 250°C inntreer begynnende dekomponering, kromatografisk rent i tert.-butanol/iseddik/vann/pyridin (60:6:24:20) henholdsvis i amylalkohol/pyridin/vann (35:35:30). Utbytte 7,85 g (68% av teoretisk). C₁₇₉H₂₈₇N₃₅O₄₄Br₂S (3857,51)

Beregnet: C 55,73 H 7,50 N 12,70 O 18,25 Br 4,14 S 1,66

Funnet: C 55,64 H 7,44 N 12,69 O 18,67 Br 3,78 S 1,67

Aminosyreanalyse:

	Thr	Ser	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	Ala	Glu	Phe	Val
Beregnet:	2	3	4	2	1	2	2	1	2	1	1
Funnet:	1,92	2,73	4,15	1,95	0,94	2,03	1,97	1,0	2,01	1,04	1,03

Met NH₃
Beregnet: 1 3

Funnet: 1,02 3,09

12) O-tert.-butyl-L-treonyl-O-tert.-butyl-L-seryl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-O-tert.-butyl-L-seryl-N_ε-tert.-butyloksykarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-asparagyl-(β-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-seryl-L-arginyl-(hydrobromid)-L-arginyl(hydrobromid)-L-alanyl-L-glutaminyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-fenylalanyl-L-valyl-L-glutaminyl-L-tryptofyl-L-leucyl-L-metionyl-L-asparaginy-O-tert.-butyl-L-treonin-tert.-butylester-hydrobromid (7-29-hydrobromid)

3,85 g NPS-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(BOC)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(HBr)-Arg(HBr)-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu (7-29) og 13 g 2-metyllindol oppløses i ca. 500 cm³ dimetylacetamid under omrøring, blandingen tilsettes derpå etter avkjøling til 0° 100 cm³ iskald metanol og under omrøring og isavkjøling derpå 2,2 cm³ 1n-metanolisk bromhydrogensyre fortynnet med 100 cm³ metanol, dråpevis. Etter 3 timers røring ved 0° og 22 timer ved romtemperatur avdestilleres metanolen i vakuum ved 15°C badetemperatur. Derpå røres den resterende oppløsning inn i 2800 cm³ absolutt dietyleter/petroleter (25:10), den dannede felling frafiltreres etter flere timers henstand i kjøleskap, og omfelles derpå 2 ganger fra dimetylacetamid/dietyleter. Etter tørking ved 80° og 10⁻³ torr over P₂O₅: smeltepunkt = dekomposisjon fra 220°, (α)_D²⁰ = +15,27 ± 2° henholdsvis (α)₅₄₆²⁰ = +17,36° (c = 0,6 i dimetylacetamid/fosforsyre-tris-dimetylamid (9:1)). Kromatografisk rent i tert.-butanol/iseddik/vann/pyridin (60:6:24:20) henholdsvis amylalkohol/pyridin/vann (35:35:30). Utbytte 3,4 g = 88% av teoretisk.

C₁₇₃H₂₈₅N₃₄O₄₂Br₃S + 2 H₂O (3821,22)

Beregnet: C 54,37 H 7,62 N 12,58 O 18,43 Br. 6,33 S 0,85

Funnet: C 54,52 H 7,69 N 12,39 O 18,65 Br 6,28 S 0,99

Aminosyreanalyse:

	Thr	Ser	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	Ala	Glu	Phe
Beregnet:	2	3	4	2	1	2	2	1	2	1
Funnet:	1,86	2,72	3,94	1,87	0,98	2,03	1,95	1,0	1,94	1,03

	Val	Met	NH ₃
Beregnet:	1	1	3
Funnet:	1,03	0,97	3,63

Fremgangsmåte for fremstilling av glukagon, k a r a k t e r i -
s e r t ved at man kondenserer et peptid med glukagon-sekvens 7 til
29 med formel

7 8 9 10 11 12

-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr(tBu)-OtBu (I)

med et overskudd av et peptid med glukagon-sekvensen 1-6 med formel

1 2 3 4 5 6

ved hjelp av karbodiimider i nærvær av N-hydroksytravsyreimid eller N-hydroksyftalimid, og i det således fremstilte beskyttede glukagon med formel

- 1 - - 2 - - 3 - - 4 - - 5 - - 6 - - 7 - - 8 -

-Ser(tBu)-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

- Thr(tBu)(OtBu) (III)

avspalter beskyttelsesgruppene ved hjelp av trifluoreddiksyre.

Anførte publikasjoner:
Peptides, Proc.Eur.Peptide Symp.8th.
Norwijk 1966, p.245-57