

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Teilweise bestätigt gemäß § 18 Absatz 1
Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **139 125 B1**

4(51) **E 07 K 7/06**

C 07 K 7/22

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 07 K / 205 857 4

(22) 08.06.78

(45) 25.11.87

(44) 12.12.79

(71) Institut für Wirkstoffforschung der AdW der DDR, Alfred-Kowalke-Straße 4, Berlin, 1136, DD

(72) Bienert, Michael, Dr. Dipl.-Chem.; Klauschenz, Erhard, Dr. Dipl.-Chem.; Niedrich, Hartmut, Prof. Dr. Dipl.-Chem., DD

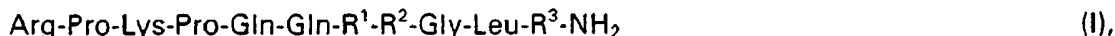
(54) Verfahren zur Herstellung von Undekapeptiden

ISSN 0433-6461

8 Seiten

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Undeka-peptiden der Formel I



worin R^1 und R^2 Phe oder am aromatischen Ring substituiertes Phe, R^2 Tyr oder am aromatischen Ring substituiertes Tyr und R^3 Met oder Nle bedeuten, durch Umsetzung der Dipeptide Arg(NO_2)-Pro-OH und H-Lys-Pro-OH, anschließende Umsetzung des erhaltenen Tetrapeptides Arg(NO_2)-Pro-Lys-Pro-OH mit dem Heptapeptid H-Gln-Gln- R^1 - R^2 -Gly-Leu- R^3 - NH_2 , wobei R^1 bis R^3 die o. g. Bedeutung haben, nach der Mischanhydrid-Synthese, Entfernung der Boc-Schutzgruppe mittels HCl in Eisessig und der NO_2 -Schutzgruppe mittels HF in Anisol und anschließende Reinigung durch Verteilungschromatographie, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Boc-Arg(NO_2)-OH als Mischanhydrid mit H-Pro-OMe kuppelt und zum Dipeptid Boc-Arg(NO_2)-Pro-OH verseift, sowie Z-Lys(Boc)-OTcp mit dem Triton-B-Salz von Prolin nach der Aktivester-Methode umsetzt und das Umsetzungsprodukt zum Dipeptid H-Lys(Boc)-Pro-OH hydriert, anschließend die beiden Dipeptide nach der Mischanhydrid-Methode in das geschützte Tetrapeptid Boc-Arg(NO_2)-Pro-Lys-(Boc)-Pro-OH überführt und dieses in an sich bekannter Weise mit dem Heptapeptid H-Gln-Gln- R^1 - R^2 -Gly-Leu- R^3 - NH_2 umsetzt, Schutzgruppen abspaltet und reinigt.

Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Herstellung von Undeka-peptiden der allgemeinen Formel I, in der R^1 und R^2 für Phe, am aromatischen Ring substituiertes Phe und andere Aminosäurereste und R^3 für Met und Nle stehen,



wobei R^1 , R^2 und R^3 vorzugsweise folgende Bedeutung haben:

$\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{Phe}, \text{R}^3 = \text{Met}$	Substanz P
$\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{Phe}, \text{R}^3 = \text{Nle}$	Nle ¹¹ -Substanz P
$\text{R}^1 = \text{Phe}, \text{R}^2 = \text{Tyr}, \text{R}^3 = \text{Met}$	Tyr ⁸ -Substanz P
$\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{Phe (Cl)}, \text{R}^3 = \text{Nle}$	Phe (Cl) ^{7,8} , Nle ¹¹ -Substanz P
$\text{R}^1 = \text{Phe}, \text{R}^2 = \text{Tyr}, \text{R}^3 = \text{Nle}$	Tyr ⁸ , Nle ¹¹ -Substanz P
$\text{R}^1 = \text{Phe}, \text{R}^2 = \text{Tyr (J}_2), \text{R}^3 = \text{Nle}$	Tyr (J ₂) ⁸ , Nle ¹¹ -Substanz P

Bei den drei letztgenannten Analogen handelt es sich um neue Verbindungen.

Anwendungsgebiet der Erfindung

SP ist aus dem Darm und dem Hypothalamus von Säugetieren isoliert und inzwischen auch in Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems nachgewiesen worden. SP wirkt auf die glatte Muskulatur tonisierend und kontrahierend, stimuliert die Speicheldrüsen, senkt den Blutdruck und spielt im ZNS eine Rolle als Transmitter bzw. Modulator bei der Übertragung sensorischer Reize. SP, SP-Analoga, verkürzte C-terminale SP-Sequenzen und deren pharmazeutisch anwendbare Addukte und Salze haben Aussicht, in der Gastroenterologie zur Verdauungsregulation und als ZNS-Pharmakon am Menschen sowie als Veterinärpharmakon in Anwendung zu kommen.

Einige der aufgezählten Verbindungen I sind Vorstufen für radioaktiv markierte Produkte.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Synthese von Substanz P und analoger Verbindungen ist mehrfach beschrieben worden, z. B. nach der Merrifield-Methode von G. W. Tregear und Mitarb., Nature New Biology 232, 87 (1971). J. L. M. Syrier und Mitarb. in „Peptides 1974“. Proceedings of the 13. European Peptide Symposium, Israel 1974, ed. Y. Wolman, 1975, Wiley, New York u. Toronto and Israel Universities Press, Jerusalem, 1975 S. 105, J. v. Rietschoten und Mitarb., ibid. S. 113; G. H. Fisher und Mitarb., J. Med. Chem. 17, 843 (1974); R. W. Bury und Mitarb., J. Med. Chem. 19, 854 (1976).

Die durch schrittweisen Aufbau am festen oder löslichen (E. Bayer und Mitarb., Chem. Ber. 107, 1344 [1974]) polymeren Träger ohne Isolierung von Zwischenprodukten erhaltenen Produkte genügen in Qualität, Quantität und Reproduzierbarkeit nicht den Ansprüchen, wie sie für eine pharmazeutische Anwendung zu stellen sind.

Die Herstellung von SP sowie einiger Analoga erfolgte auch durch Anwendung konventioneller Methoden. Hierbei gelangte sowohl die Synthese durch stufenweisen Aufbau (J. Bergmann u. Mitarb., Experientia 30, 401 [1974]) als auch durch Fragmentkondensation (H. Yajima u. Mitarb., Chem. Pharm. Bull. 21, 2500 [1973], F. K. Mutulis u. Mitarb., 3. Allunions Symp. „Chemie der Peptide und Proteine“ Kiew 1974 — Abstracts S. 103; R. O. Studer und Mitarb., Substance P, ed. by U. S. v. Euler und B. Pernow, Raven Press, New York 1977, S. 15; N. Yanaihara und Mitarb., ibid., S. 27; H. Yajima und Mitarb., Chem. Pharm. Bull. 24, 544 [1976]) zur Anwendung.

Die stufenweise Synthese erschwert die Herstellung von Peptidmengen im Gramm-Maßstab und ist für die Synthese von Analoga unrationell. Eine Synthese (Substanz P, Raven Press, New York 1977, S. 15), die zwei Fragmentkondensationen einschließt, beinhaltet die nachteilige Aktivierung von racemisierungsgefährdeten Aminosäuren. In der in Chem. Pharm. Bull. **21**, 2500 (1973) beschriebenen Synthese von Substanz P werden Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen verwendet, deren acidolytische Abspaltung von irreversiblen Nebenreaktionen am Methionin begleitet sein können. Von Nachteil ist auch die Umsetzung von Z(OMe)-Lys(Z)-OPcp mit dem Triethylaminsalz des Prolins in wäßrig/organischem Milieu im Rahmen der Herstellung des Fragments Z(OMe)-Lys(Z)-Pro-OH, da unter diesen Bedingungen stets eine partielle Hydrolyse des Aktivesters erfolgt und das so erhaltene Dipeptid das kaum abtrennbare Z(OMe)-Lys(Z)-OH als Verunreinigung enthält. Die Kupplung der Dipeptide zum N-term. Tetrapeptid wird über den zusätzlich herzustellenden Aktivester Z-Arg(NO₂)-Pro-OPcp realisiert und liefert nur mäßige Ausbeuten (41 %). Auch die Kondensation des N-term. Tetrapeptides mit dem C-term. Heptapeptid mittels DCC/HOBt liefert mit 67 % nur mäßige Ausbeuten. Zudem muß bei den langen Kupplungszeiten (48 Std.) bei Peptiden mit N-term. Glutaminsäurerest mit erheblicher Pyroglutaminylpeptid-Bildung gerechnet werden. Diese Faktoren führen insgesamt zu einer nicht befriedigenden Gesamtausbeute des in Chem. Pharm. Bull. **21**, 2500 (1973) beschriebenen Verfahrens (siehe Tab. 1).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, Methoden der Peptidsynthese in der Weise zu kombinieren, daß Substanz P und darüber hinaus im C-terminalen Bereich modifizierte Substanz P-Sequenzen der allgemeinen Formel I in hoher Ausbeute und hoher Reinheit im Gramm-Maßstab bei minimalem Reinigungsaufwand hergestellt werden können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß ein geschütztes N-terminales Tetrapeptid der Sequenz Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Pro, aufgebaut aus den Dipeptiden Boc-Arg(NO₂)-Pro-OH und H-Lys(Boc)-Pro-OH, mit Heptapeptiden der Sequenz Gln-Gⁿ-R¹-R²-Gly-Leu-R³-NH₂, in dem R¹ bis R³ die o. g. Bedeutung haben, nach der Mischanhydrid-Methode umgesetzt werden und die Schutzgruppen anschließend entfernt werden. Zum Aufbau des Tetrapeptides Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Pro-OH wird Boc-Nitroarginin als Mischanhydrid mit ProOMe gekuppelt und zum Boc-Arg(NO₂)-Pro-OH verseift. Für die Umsetzung von Z-Lys(Boc)-OTcp mit Pro wird Prolin als Triton-B-salz in wasserfreiem Dimethylformamid eingesetzt. Z-Lys(Boc)-Pro-OH wird durch katalytische Hydrierung in H-Lys(Boc)-Pro-OH umgewandelt und dieses mittels Mischanhydrid-Synthese in das geschützte Tetrapeptid Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Pro-OH überführt. Die Herstellung des C-terminalen Heptapeptides H-Gln-Gln-Phe-Gly-Leu-MetNH₂ erfolgt nach einem bekannten Verfahren (M. Bienert und Mitarb., DD-PS 108744 vom 3. 12. 1973). Die C-terminalen Heptapeptide, die Norleucin, Tyrosin oder p-Chlorphenylalanin enthalten, werden durch stufenweisen Aufbau über Mischanhydride oder Aktivester unter Verwendung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe hergestellt, können aber auch mit Hilfe anderer an sich bekannter peptidchemischer Methoden gewonnen werden.

Die Entfernung der Schutzgruppen von den Undeca-peptiden im Falle R³ = Met erfolgt entweder durch Behandlung mit HF und nachfolgendes Erwärmen in wäßriger Lösung oder durch separate Abspaltung der Boc-Schutzgruppen in an sich bekannter Weise und nachfolgendes Behandeln mit HF. Der Syntheseweg ist im Formelschema I zusammengestellt.

Das Verfahren weist einige Vorteile auf: So erfolgt die Umsetzung von Z-Lys(Boc)-OTcp mit Prolin über dessen Triton B-Salz in wasserfreiem DMF, wodurch die nachteilige, bei Arbeiten in wäßrig/organischem Milieu zu beobachtende teilweise Hydrolyse des Aktivesters unter Bildung des auf rationellem Wege nicht abtrennbaren Z-Lys(Boc)-OH vermieden wird. Durch den Einsatz von Carboxyl-ungeschützten Prolin wird die bei Einsatz von Prolinmethylethyl oder -benzylestern nicht zu unterdrückende Diketopiperazin-Bildung verhindert. Das auf diese Weise hergestellte Dipeptid kann mit Ausbeuten > 90 % hergestellt werden. Von Vorteil sind auch die durch Anwendung der Mischanhydrid-Methode erzielbaren hohen Ausbeuten der 2 + 2 sowie der 4 + 7-Fragmentkondensationen, die ebenfalls deutlich höher liegen, als die in Chem. Pharm. Bull. **21**, 2500 (1973) angegebenen (Tab. 1). Die so erhaltenen Tetra- bzw. Undeca-peptide fallen auch in besserer Reinheit an, da sie nicht durch Dicyclohexylharnstoff und HOBt verunreinigt sind. Die Mischanhydrid-Synthese gestattet eine Kupplung von Tetra- mit Heptapeptid innerhalb wesentlich kürzerer Zeiten, als dies mit der DCC/HOBt-Methode möglich ist, so daß die bei Fragmentkondensationen mit N-term. Glutaminrest als Konkurrenzreaktion ablaufende Cyclisierung unter Bildung von Pyroglutaminyl-Heptapeptid stark reduziert werden kann (< 2%). Dies führt zu einer höheren Reinheit der Undeca-peptide, so daß sich auch die Reinigungsausbeute erhöht (Tab. 1).

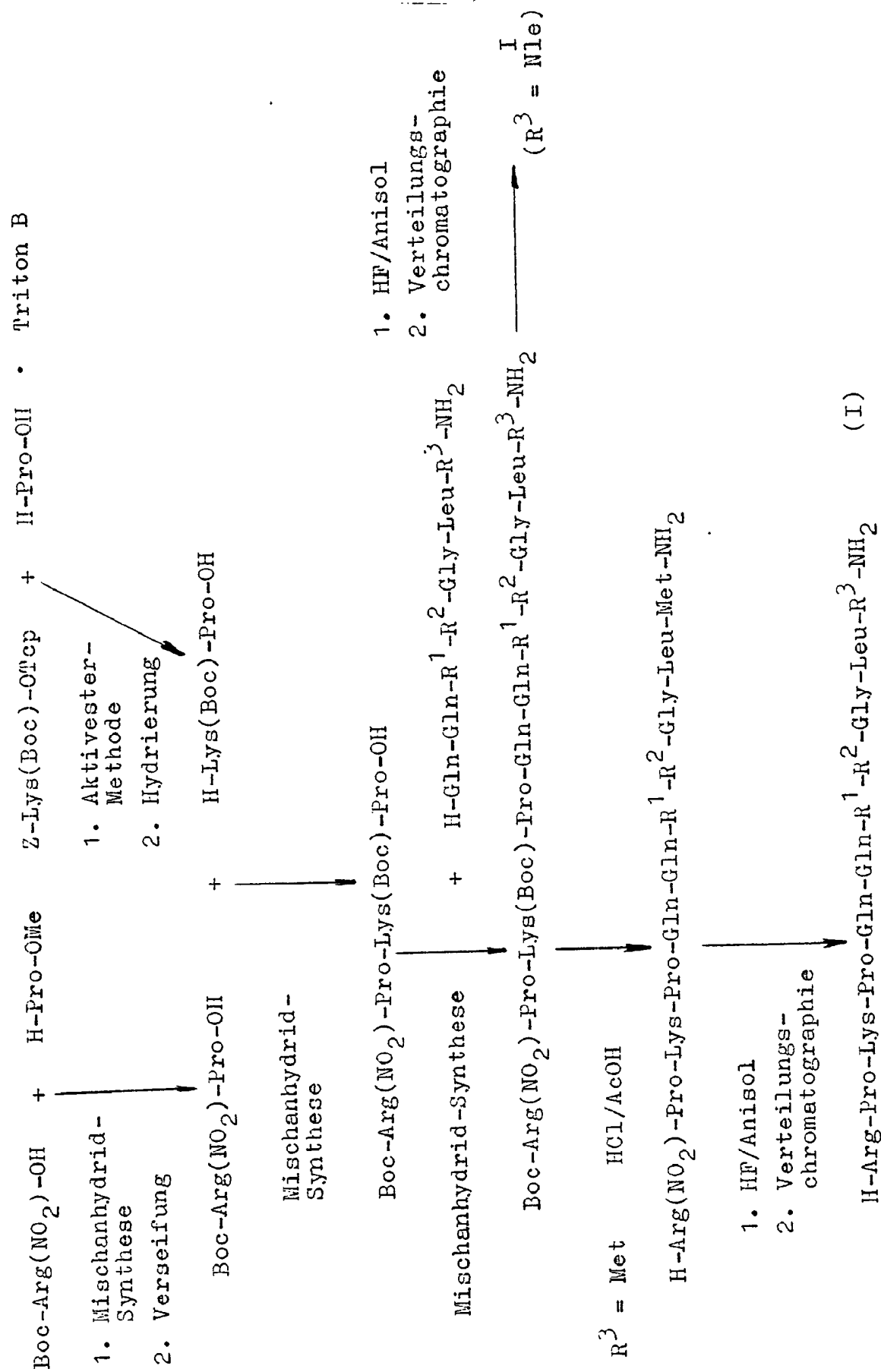
Die erfindungsgemäß hergestellte Peptide (R³ = Met) enthalten neben < 5 % der Ausgangsfragmente ca. 5 % S-Oxid, die durch Verteilungschromatographie an Sephadex G 25 abgetrennt werden. Eine Reinigung kann auch durch Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose erfolgen. Die erhaltenen Produkte I werden in hoher Ausbeute erhalten und sind chromatographisch und elektrophoretisch rein (Reinheit > 98 % an gewünschtem Peptid gemäß HPLC-Untersuchung).

Tabelle 1 Bei der Herstellung der N-term. Tetrapeptidsequenz, der Fragmentkondensation sowie der Reinigung erhaltene Ausbeuten im Vergleich zu Chem. Pharm. Bull. 21, 2500 (1973)^{*)}

Peptid ^{*)}	Ausbeute (%) ^{*)}	Peptid	Ausbeute (%)
Z-Arg(NO ₂)-Pro-OH	80	Boc-Arg(NO ₂)-Pro-OMe	70
Z-Arg(NO ₂)-Pro-OPfp	82	Boc-Arg(NO ₂)-Pro-OH	75
Z(OMe)-Lys(Z)-Pro-OH	74	Z-Lys(Boc)-Pro-OH	95
Z-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Z)-Pro-OH	41	Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Z)-Pro-OH	70
Substanz P (geschützt)	67	Substanz P (geschützt)	85
Substanz P (gereinigt)	37	Substanz P (gereinigt)	60
Gesamtausbeute, bezogen auf eingesetztes Arg-Derivat	5	Gesamtausbeute, bezogen auf eingesetztes Arg-Derivat	18 ^{*)}
auf eingesetztes Lys-Derivat	7	auf eingesetztes Lys-Derivat	34

^{*)} Die anderen Undeca-peptide der allg. Formel I werden in Gesamtausbeuten von 11–23% erhalten

Schema I



Die folgenden Beispiele sollen das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I näher erläutern.

Systeme für die Dünnschichtchromatographie (Silufol-Fertigplatten):

A n-Butanol/Eisessig/Wasser	4/1/1
B Chloroform/Methanol/Wasser	40/15/5
C Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser	120/20/6/11
D n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser	20/12/2/14
E Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser	60/20/6/11

Beispiel 1:

Boc-Arg(NO₂)-OH (20 mMol) in 60 ml THF werden bei -15°C mit 2,22 ml (20 mMol) N-Methylmorpholin und (20 mMol) 2,62 ml Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Nach 5 min setzt man 4,00 g H-Pro-OMe · HCl (24 mMol) und 2,68 ml N-Methylmorpholin (24 mMol) in 30 ml DMF zu und rührt 1 h bei -10°C und 2 h bei Raumtemperatur. Es wird i. Vak. eingeeengt und das verbleibende Öl in Essigester/halbgesättigter wäßriger NaCl-Lösung aufgenommen. Die Essigesterphase wird mit 5%iger KHSO₄-Lösung, NaCl-Lösung, 5%iger NaHCO₃-Lösung und halbges. NaCl-Lösung extrahiert, mit MgSO₄ getrocknet und nach dem Filtrieren eingeeengt. Man erhält 5,4 g des Methylesters als weißen Schaum (70% d. Th.).

$[\alpha]_D^{20} = -44^\circ$ (c = 1, Aceton), Rf (C) = 0,80 sowie schwacher Nebenleck bei Rf 0,50.

4,8 g Boc-Arg(NO₂)-ProOMe werden in 20 ml Ethanol gelöst und mit 15 ml 1 N NaOH versetzt. Nach 60 min wird i. Vak. eingeeengt, der Rückstand in 20 ml 5%iger NaHCO₃ aufgenommen und mit Essigester 3× ausgeschüttelt. Man stellt mit KHSO₄-Lösung pH 3,0 ein, sättigt die Lösung mit K₂SO₄ und extrahiert 5× mit je 30 ml Chloroform. Die Aufarbeitung der organischen Phase liefert 3,6 g Boc-Arg(NO₂)-Pro-OH als weißen Schaum (75% d. Th.).

$[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$ (c = 1; Methanol), Rf (A) = 0,75, Rf (C) = 0,3,

C₁₆H₂₈N₆O₇ (416,4) Ber.: C 46,15 H 6,78 N 20,18
Gef.: C 46,92 H 7,08 N 19,37

Beispiel 2:

H-Lys(Boc)-Pro-OH

2,30 g Prolin (20 mMol) werden in 20 ml Methanol gelöst und 10 ml einer 40%igen methanolischen Triton B-Lösung versetzt. Das Methanol wird abdestilliert, der Rückstand 2× in 20 ml DMF weitgehend gelöst und das DMF im Ölpumpenvakuum jeweils wieder abdestilliert. Das Triton B-Salz wird in 40 ml DMF suspendiert und mit 5,60 g Z-Lys(Boc)-OTcp (10 mMol) bei 0°C versetzt. Es entsteht sofort eine klare Lösung, die Reaktion ist nach 5 min beendet. Das DMF wird im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wird in 50 ml 5%iger NaHCO₃-Lösung aufgenommen und 3× mit Essigester extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit 5%iger KHSO₄-Lösung angesäuert (pH 3,0) und das ausfallende Öl durch Extraktion mit 4× 50 ml Essigester aufgenommen. Der Extrakt wird mit wenig H₂O gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das nach Filtration und Einengen erhaltene Öl enthält noch beträchtliche Mengen Trichlorphenol, die durch dreimaliges Umfällen aus Ether/Petrolether (30–50°C) entfernt werden. Nach Entfernung letzter Lösungsmittelreste i. Vak. erhält man einen Schaum. Ausbeute 4,5 g (95% d. Th.) bezogen auf Z-Lys(Boc)-OTcp.

$[\alpha]_D^{20} = -33^\circ$ (c = 1; Essigester), Rf (E) = 0,6 Das Produkt ist frei von Z-Lys(Boc)-OH.

C₂₄H₃₅N₃O₇ (477,5) Ber.: C 60,34 H 7,39 N 8,80
Gef.: C 60,88 H 7,52 N 8,10

2 g Z-Lys(Boc)-Pro-OH werden in 70%igem Methanol gelöst, mit PdO/BaSO₄ versetzt und 3 h bei Raumtemperatur hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und der Überstand zur Trockne eingeeengt. Das deblockierte Dipeptid H-Lys(Boc)-Pro-OH wird in quantitativer Ausbeute als festes Harz erhalten.

F. 107–111°C, $[\alpha]_D^{20} = -47^\circ$ (c = 1; Methanol) Rf (A) = 0,35, C₁₆H₂₉N₃O₅ (343,4).

Beispiel 3:

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys-(Boc)-Pro-OH

1,7 g (5 mMol) frisch hergestellte Aminokomponente H-Lys(Boc)-Pro-OH und 0,63 ml N-Äthylmorpholin in 20 ml DMF werden auf -20°C gekühlt und zu einer Lösung von 1,66 g (4 mMol) Boc-Arg(NO₂)-Pro-OH und 0,504 ml (4 mMol N-Ethylmorpholin) in 20 ml DMF gegeben, die 20 min bei -15°C bis -10°C mit 0,544 ml (4 mMol) Chlorameisensäureisobutylester reagiert hatte. Man rührt 1 h bei -10°C und 2 h bei 0°C, entfernt das DMF im Ölpumpenvakuum, nimmt den Rückstand in 50 ml Essigester und 50 ml 5%iger KHSO₄-Lösung auf, extrahiert die wäßrige Phase 3× mit Essigester, wäscht die vereinigte, organische Phase 2× mit 5%iger KHSO₄-Lösung und 2× mit halbkonzentrierter NaCl-Lösung. Nach dem Trocknen wird eingeeengt und mit Ether verrieben. Man erhält 2,44 g (85%) weißes Pulver, das neben der Tetrapeptidsäure (Rf(C) 0,70) noch geringe Mengen Carboxylkomponente (Rf(C) 0,60) sowie zwei unpolare Nebenprodukte enthält, die durch zweimaliges Umfällen aus Chloroform/Ether entfernt werden können. Ausbeute 2,07 g (70%, bezogen auf eingesetztes Boc-Arg(NO₂)-Pro-OH).

F. Erweichen ab 164–168°C, $[\alpha]_D^{20} = -69,5^\circ$ (c = 1; Methanol)

C₃₂H₅₅N₉O₁₁ (741,8) Ber.: C 51,81 H 7,47 N 16,99
Gef.: C 50,98 H 7,21 N 16,23

Beispiel 4:

Boc-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂

Die Herstellung von Boc-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂ ausgehend von H-Gly-Leu-MetNH₂ (B. Mehlig und Mitarb., J. prakt. Chem. 314, 390 [1972]) unter Verwendung von Boc-Phe-OTcp und Mischanhydrid-Kupplungen von Boc-Gln-OH erfolgte nach M. Bienert und Mitarb., DDR-Pat. 108744, 3. 12. 1973.

Die im folgenden aufgeführten Analoga dieses Heptapeptides werden ebenfalls nach diesem Verfahren hergestellt.

Boc-Gln-Gln-Phe(Cl)-Phe(Cl)-Gly-Leu-NleNH₂:

F. 260–70°C (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -26^\circ$ (c = 1; DMF), Rf(A) = 0,76, Rf(B) = 0,55, Rf(C) = 0,23;

C₄₇H₆₈N₁₀O₁₁Cl₂.

Boc-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-NleNH₂:

F. 260–5°C (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$ (c = 1; DMF), Rf(A) = 0,73, Rf(B) = 0,52, Rf(C) = 0,19,

C₄₇H₁₀N₁₀O₁₁.

Boc-Gln-Gln-Phe-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-NleNH₂:

F. 269–72°C (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ (c = 1; DMF), Rf(A) = 0,75, Rf(B) = 0,55, Rf(C) = 0,23;

C₅₄H₇₆N₁₀O₁₂.

Boc-Gln-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-MetNH₂:

F. 208–224°C (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -29^\circ$ (c = 1; DMF), Rf(A) = 0,68, Rf(B) = 0,45, Rf(C) = 0,13;

C₄₆H₆₇N₁₀O₁₂S (984,2) Ber.: C 56,14 H 6,86 N 14,23

Gef.: C 55,69 H 6,82 N 13,87

Beispiel 5:

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂

1,93 g (2,61 mMol) Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Pro-OH in 40 ml DMF werden mit 0,33 ml (2,61 mMol) N-Ethylmorpholin und nach Kühlen auf –20°C mit 0,356 ml (2,61 mMol) Chlorameisensäureisobutylester versetzt. Man rührt 20 min bei –15°C und setzt 2,35 g (2,61 mMol) frisch hergestelltes Heptapeptid H-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂ · HCl — erhalten durch Behandlung von Boc-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂ mit HCl/Eisessig — und 0,365 ml N-Ethylmorpholin (2,90 mMol) in 40 ml DMF (das Heptapeptid löst sich nicht vollständig) bei –20°C zu. Es wird 1 h bei –10°C bis –5°C und 2 h bei +5°C gerührt und die klare Lösung aufgearbeitet, wie bei Beispiel 3 angegeben. Man erhält 3,5 g weißes Pulver (85% d. Th.), F. 208–218°C (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -48,5^\circ$ (c = 0,5; DMF), Rf(A) = 0,5, Rf(D) = 0,8;

C₇₃H₁₁₃N₁₉O₁₉S (1592,9)

Die folgenden aufgeführten Analoga werden ebenfalls nach diesem Verfahren hergestellt.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Pro-Gln-Gln-Phe(Cl)-Phe(Cl)-Gly-Leu-NleNH₂:

Rf(A) = 0,43, Rf(D) = 0,76, Ausbeute 91%.

C₇₄H₁₁₃N₁₉O₁₉Cl₂

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-NleNH₂:

F. 260–262°C (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$ (c = 0,25; Eisessig), Rf(A) = 0,40, Rf(B) = 0,51, Rf(C) = 0,12; Ausbeute 89%.

C₇₄H₁₁₅N₁₉O₁₉

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Pro-Gln-Gln-Phe-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-NleNH₂:

F. 230–232°C (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -52^\circ$ (c = 0,5; Eisessig), Rf(A) = 0,43, Rf(B) = 0,53, Rf(C) = 0,15; Ausbeute 82%.

C₈₁H₁₂₁N₁₉O₂₀

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Pro-Gln-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-MetNH₂:

F. Erweichen oberhalb 150°C $[\alpha]_D^{20} = -57^\circ$ (c = 0,5; Eisessig), Rf(A) = 0,40, Rf(B) = 0,49, Rf(D) = 0,68, Ausbeute 90%.

C₇₃H₁₁₃N₁₉O₂₀S Ber.: C 54,53 H 7,02 N 16,55

Gef.: C 53,95 H 7,32 N 16,05

Beispiel 6:

H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂ über H-Arg(NO₂)-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂

3,11 g Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂ werden 30 min mit HCl/Eisessig gerührt und das Reaktionsprodukt durch Fallen mit Ether isoliert. Man erhält 3,0 g H-Arg(NO₂)-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂ als weißes Pulver.

F. 164–178°C, $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ (c = 0,5; DMF), Rf(D) = 0,45 sowie schwacher Fleck bei Rf(D) = 0,42 (identifiziert als Sulfoxid)

3,0 g [Arg(NO₂)]⁺-Substanz P werden mit 3 ml Anisol und 30 ml HF 45 min bei 2°C gerührt. Der Fluorwasserstoff wird abdestilliert und der Rückstand mehrmals mit Ether verrieben. Zur Reinigung werden 500 mg Rohprodukt in 50 ml 1 M Essigsäure gelöst, filtriert, 3× mit Essigester extrahiert, über eine Säule 10 × 1 cm, gefüllt mit Wofatit AK 40, Acetat-Form, in das Acetat überführt und lyophilisiert. Man erhält 450 mg. 200 mg werden in 4 ml Oberphase des Systems n-Butanol:1% HAc:Pyridin = 5:11:3 gelöst, von aggregierter Substanz P durch Zentrifugation abgetrennt und auf eine zunächst mit Unterphase beladene, dann mit Oberphase aequilibrierte Sephadex-G-25-Säule (2 × 120 cm, Gelbettvolumen 375 ml) aufgetragen. Durch Elution (Tropfgeschwindigkeit 3 ml/30 min.) mit 160 bis 210 ml Oberphase erhält man nach Aufarbeitung und Lyophilisation 120 mg chromatographisch einheitliche Substanz P.

$[\alpha]_D^{20} = -82,5^\circ$ (c = 0,5; 5%ige HAc),

Rf(B) = 0,05, Rf(D) = 0,40, Elektrophorese einheitlich; Aminosäureanalyse: Arg 0,99 (1); Pro 2,07 (2); Lys 1,00 (1), Glu 2,02 (2);

Phe 1,98 (2); Gly 1,00 (1); Leu 1,03 (1), Met 0,87.

Der Peptidgehalt des Lyophilisates beträgt 78% (ermittelt durch Aminosäure-Analyse, sowie durch Acetat- und

Wasserbestimmung; die Reinheit ist > 98% (HPLC)

Elution mit 250–330 ml Oberphase ergibt nach Aufarbeitung 15 mg Substanz P-S-Oxid.

$[\alpha]_D^{20} = -72^\circ$ (c = 0,5; 5%ige HAc), Rf(A) = 0,37, identisch mit einer aus Substanz P durch H₂O₂-Oxydation gewonnenen Probe.

Beispiel 7:

Andere Peptide der allgemeinen Formel I, in denen für R^3 Nle steht, werden direkt in an sich bekannter Weise aus den geschützten Vorstufen (z. B. den in Beispiel 5 angegebenen) durch Einwirkung von flüssigem Fluorwasserstoff in Gegenwart von Anisol erhalten.

H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe(Cl)-Phe(Cl)-Gly-Leu-NleNH₂: $[\alpha]_D^{20} = -48^\circ$ (c = 0,5; Eisessig), Rf(D) = 0,43, Rf(A) = 0,05; Aminosäureanalyse (6 N HCl/20 h): Arg 1,03(1); Pro 2,07(2); Lys 0,97(1); Glu 1,92(2); Phe(Cl) 1,92(2); Gly 0,95(1); Leu 1,00(1); Nle 1,04(1).

H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-NleNH₂:

$[\alpha]_D^{20} = -53^\circ$ (c = 0,25; Eisessig), Rf(D) = 0,40, Rf(A) = 0,05;

Aminosäureanalyse (6 N HCl/6 h): Arg 0,98(1); Pro 2,21(2); Lys 1,00(1); Glu 1,95(2); Phe 1,86(2); Gly 1,00(1); Leu 1,02(1); Nle 1,01(1).

H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-NleNH₂:

$[\alpha]_D^{20} = -53^\circ$ (c = 0,25; Eisessig), Rf(D) = 0,38, Rf(A) = 0,05;

Aminosäureanalyse (6 N HCl/20 h): Arg 1,08(1); Pro 2,22(2); Lys 1,12(1); Glu 1,98(2); Phe 1,84(1); Tyr 1,00(1); Gly 1,03(1); Leu 1,00(1); Nle 0,98(1).

Beispiel 8:

H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Tyr(J₂)-Gly-Leu-NleNH₂

10 mg H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-NleNH₂ (Beispiel 7), gelöst in 2 ml NH₄Ac-Puffer (10⁻² M, pH 6,0), werden in an sich bekannter Weise (Hung Lam Thang u. Morgat, Franz. Patent 2.039.530 vom 2. 4. 1969) mit 35 µMol Jodmonochlorid, gelöst in 350 µl Methanol, innerhalb von 3 min. zur Reaktion gebracht. Die Reaktion wird durch Zugabe von 400 µl 0,1 Na₂S₂O₃-Lösung beendet. Dabei fällt das Jodierungsprodukt teilweise aus. Die Mischung wird mit 0,1 N Essigsäure verdünnt, lyophilisiert und der erhaltene Feststoff durch Verteilungschromatographie — wie im Beispiel 6 beschrieben — gereinigt.

Rf(A) = 0,43, Nebenfleck bei Rf(D) 0,38; das UV-Spektrum (pH 6,81) zeigt ein Maximum bei 312 nm, wie für Dijodtyrosin-Verbindungen bekannt.