

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 151968 B



(21) Patentansøgning nr.: 2637/81

(51) Int.Cl.⁴ C 07 K 7/06

(22) Indleveringsdag: 16 jun 1981

C 07 K 7/48

(41) Alm. tilgængelig: 18 dec 1981

(44) Fremlagt: 18 jan 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 17 jun 1980 US 160241

(71) Ansøger: *ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION; U.S. Route No. 202; Raritan, New Jersey, US

(72) Opfinder: George *Heavner; US

(74) Fuldmægtig: Th. Ostenfeld Patentbureau A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af pentapeptidet H-ARG-X-ASP-Y-TYR-R ved opløsningssyntese

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 4190646

(57) Sammendrag:

2637-81

Peptider med formlen H-ARG-X-Z-Y-TYR-R, hvor X er LYS og Y er VAL, eller X og Y begge er SAR, Z er ASP eller GLU, og R er NH₂ eller OH, fremstilles ved opløsnings-syntese ved, at man omsætter H-Y-TYR-R', hvor R' er OU eller NH₂, og U er eventuelt i phenylgruppen halogen- eller (C₁₋₃)alkyl-substitueret benzyl, med α-T-X-w-U-Z-OH, hvor T er forskellige α-amino-beskyttende grupper og X er SAR eller ε-T"-LYS, hvor T" er forskellige ε-amino-beskyttende grupper, til dannelse af α-T-X-w-U-Z-Y-TYR-R', som efter fjernelse af T omsættes med α-T-w-T'-ARG, hvor T' er forskellige guanidino-beskyttende grupper, til dannelse af α-T-w-T'-ARG-(ε-T') X-w-U-Z-Y-TYR-R', hvorfra U, T, T' og T" fjernes, og det resulterende peptid isoleres og renses.

Alternativt kan H-Y-TYR-R' omsættes med α-T-w-U-Z-OH til dannelse af α-T-w-U-Z-Y-TYR-R', som efter fjernelse af T omsættes med α-T-X til dannelse af α-T-X-w-U-Z-Y-TYR-R', der omdannes videre som ovenfor, eller H-w-U-Z-Y-TYR-R' kan omsættes med α-T-w-T'-ARG-X-OH til dannelse af α-T-w-T'-ARG-X-w-U-Z-Y-TYR-R', der omdannes videre som ovenfor.

DK 151968 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af pentapeptidet H-ARG-X-ASP-Y-TYR-R, hvori X er LYS, og Y er VAL, eller X og Y begge er SAR, og R er OH eller NH₂, ved opløsningssyntese.

05 Beskrivelsen til USA-patentskrift nr. 4.190.646 og dansk patentansøgning nr. 1557/80, indleveret d. 11. april 1980, omhandler forskellige peptider, der er nyttige på thymus-funktionelle og immunologiske områder. Det nævnte patent omhandler "thymopoietin-pentapeptidet" (TP5) og substituerede derivater deraf, hvorimod den
10 nævnte ansøgning omhandler peptidaloger af TP5, som har større styrke end TP5. I det nævnte patent og den nævnte ansøgning blev peptiderne fremstillet ved fastfase-synteseteknikker, der i almindelighed beskrives som "Merrifield-syntese". Patentet og ansøgningen omtaler også, at klassiske metoder (dvs. opløsningssynteseteknikker)
15 kan anvendes til fremstilling af visse af disse materialer, men der var ikke beskrevet nogen specifik klassisk metode eller syntesevej.

 Mens fastfase-syntesemetoden ifølge Merrifield er bekvem til fremstilling af små mængder peptider i laboratoriemålestok, er den
20 upraktisk og i almindelighed uøkonomisk til fremstilling af store mængder (fx. mere end ca. 100 g) peptid, hvor opløsningssynteseteknikken er mere hensigtsmæssig. Endvidere er opløsningssyntesemetoder i almindelighed langt mindre kostbare end fastfase-metoder p.g.a. de langt mindre enhedsomkostninger for visse af de anvendte reagenser. Blandt den store mængde af opløsningssyntesemetoder,
25 som er tilgængelige for anvendelse ved fremstilling af polypeptider, er der nu fundet bestemte syntesemetoder, som bekvemt og på økonomisk måde giver det ønskede peptid i overraskende højt udbytte.

 En af disse fremgangsmåder omfatter følgende trin:

- 30
- a) dannelse af fragment I, som består af H-Y-TYR-R' som beskrevet nedenfor,
 - b) tilsætning af en beskyttet Z-del (alfa-T-omega-U-Z-OH) til fragment I til dannelse af fragment IV, som består af
35 alfa-T-omega-U-Z-Y-TYR-R' som beskrevet nedenfor,
 - c) fjernelse af den beskyttende gruppe T fra alfa-amino-positionen af Z-delen af fragment IV til dannelse af frag-

- ment IVA,
- d) dannelse af fragment III, som består af alfa-T-epsilon-T'-X-omega-U-Z-Y-TYR-R' som beskrevet nedenfor,
 - e) fjernelse af den alfa-aminobeskyttende gruppe T til opnåelse af fragment IIIA,
 - f) tilsætning af en beskyttet L-arginin-del (alfa-T-omega-T'-ARG-OH) til fragment IIIA som beskrevet nedenfor til dannelse af det beskyttede pentapeptid,
 - g) fjernelse af de beskyttende grupper, og
 - h) isolering og rensning af det resulterende peptid.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved de i kravets kendetegnende del anførte træk.

Den alfa-aminobeskyttende gruppe T kan være den samme eller forskellig for hver af de ovenfor nævnte aminosyrer og bør være stabil mod fjernelse ved de til sammenbinding af aminosyregrupperne anvendte trin samtidig med, at den let skal kunne fjernes ved afslutningen af de forbindende trin under betingelser, som ikke vil spalte nogen af peptidets amidbindinger. For nogle grupper (fx. BOC) forårsages denne fjernelse af stærk syre (fx. trifluoreddikesyre), hvilket resulterer i et ubeskyttet mellemprodukt, der opnås som det tilsvarende syreadditionssalt (fx. som trifluoracetat).

Den guanidinobeskyttende gruppe T' kan være en hvilken som helst passende aminobeskyttende gruppe, som nedenfor beskrevet, eller en nitrogruppe samt syreadditionssalte såsom hydrochloridet. Blandt de aminobeskyttende grupper foretrækkes urethan-beskyttende grupper (formel a) nedenfor) og substituerede syrederivater såsom p-methoxybenzensulfonyl og tosyl. Hydrochloridsaltet foretrækkes mest. Denne guanidinobeskyttende gruppe er heri kaldt "omega"-gruppe for at indikere, at den befinder sig ved kædens ende. Den nøjagtige position af mange guanidinobeskyttende grupper på kæden kendes ikke med sikkerhed.

Selvfølgelig skal, hvis X er LYS, dens epsilon-aminogruppe også være passende beskyttet af den aminobeskyttende gruppe T" under fremstilling af fragmenter, som indeholder X, og deres anvendelse til fremstilling af slutproduktpeptidet. T"-gruppen må let kunne fjernes under betingelser, som ikke vil ødelægge det resulterende

rende peptid samtidig med, at den bør være stabil under fjernelsen af T-grupperne.

Den carboxybeskyttende gruppe U bør let kunne fjernes under betingelser, som ikke vil ødelægge det resulterende peptid samtidig med, at den er stabil under fjernelsen af T-grupperne.

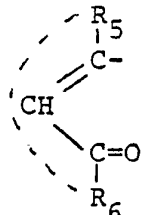
R'-gruppen er enten NH_2 (for produktpeptider, hvor R er NH_2) eller OU (for produktpeptider, hvor R er OH).

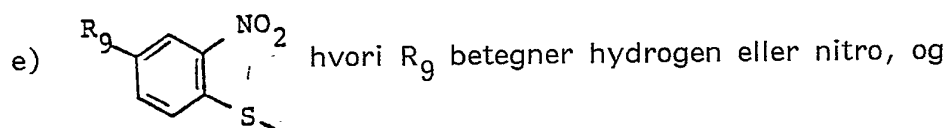
Eksempler på egnede aminobeskyttende grupper er sådanne med formlen:

a) $\text{R}_1-\text{OC}(=\text{O})-$, hvori R_1 betegner phenyl, tolyl, xylyl, adamantyl, allyl, β -cyanoethyl, fluorenylmethyl, benzyl, benzyl, hvori phenylringen er substituert med fra 1-3 substituent-
ter udvalgt blandt halogen, nitro, lavere alkyl og lavere alkoxy, diisopropylmethyl, diphenylmethyl, cyclohexyl, cyclopentyl, vinyl, t-butyl, t-amyl, dimethyltrifluormethylmethyl eller dimethylbiphenylmethyl,

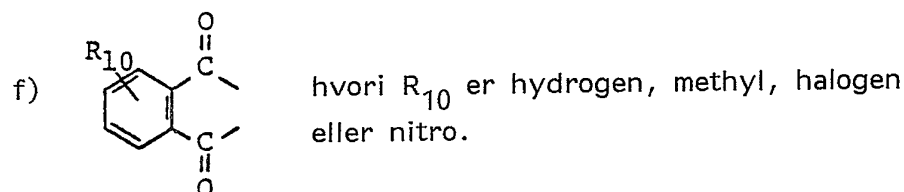
b) $\text{R}_2-\text{C}(=\text{O})-$, hvori R_2 betegner lavere alkyl med 2-4 carbonatomer såsom ethyl, isopropyl og t-butyl eller lavere alkyl med 1-4 carbonatomer substituert med fra 1-5 halogen-grupper såsom trifluormethyl, chlormethyl og pentachlor-ethyl,

c) $\text{R}_3\text{O}-\text{P}(=\text{V})(\text{OR}_4)-$, hvori V betegner S eller O, og R_3 og R_4 hver be-
tegner benzyl eller lavere alkyl,

d)  hvori R_5 og R_6 hver for sig betegner lavere alkyl eller tilsammen betyder $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{R}_7)(\text{R}_8)-\text{CH}_2-$,
hvori R_7 og R_8 hver for sig betegner hydrogen eller lavere alkyl, og



05



10

Den aminobeskyttende gruppe f), som er bidentat, kan alene anvendes for α -aminogrupperne i L-arginin eller L-valin eller α -amino- og epsilon-aminogrupperne i L-lysin, men ikke for α -aminogruppen i sarcosin. Den aminobeskyttende gruppe på sarcosinets α -aminogruppe skal være monodentat p.g.a. methylsubstituenten på denne aminogruppe. De øvrige aminobeskyttende grupper kan anvendes på alle aminosyrer.

Som her anvendt, omfatter "halogen" fluor, chlor, brom og iod, men chlor og brom foretrækkes. Udtrykkene "lavere alkyl" og "lavere alkoxy" omfatter hhv. mættede alifatiske carbonhydrider med 1-6 carbonatomer såsom methyl, ethyl, isopropyl, t-butyl og n-hexyl og de tilsvarende alkoxygrupper såsom methoxy, ethoxy, isopropoxy, t-butoxy og n-hexoxy. Methyl er den foretrukne lavere alkyl, og methoxy er den foretrukne lavere alkoxy.

De til indføring af disse beskyttende grupper anvendte reagenser (sædvanligvis de tilsvarende syrechlorider, selvom andre derivater kan anvendes), omtales under tiden her som "beskyttelsesgruppereagenser". Andre egnede beskyttende grupper er omhandlet i fx. "Protective Groups in Organic Chemistry", J.F.W. McOmie, ed., Plenum Press, N.Y., 1973.

Det foretrækkes, at hvert T og T' er ens, og at de er benzyl-oxycarboxy (CBZ) eller trifluoracetyl (TFA). Det foretrækkes, at T' er hydrochloridsaltet.

En lang række forskellige reagenser kan anvendes til fremstilling af de ovenfor beskrevne carboxyaktiverede beskyttede aminosyrerester.

En type carboxyaktiveret beskyttet aminosyrerest er en reakt-

tiv ester. Eksempler på midler, som kan anvendes til fremstilling af egnede aktive estere er phenol, phenol hvori phenylringen er substitueret med 1-5 substituenten udvalgt blandt halogen, (fx. chlor eller fluor), nitro, cyano og methoxy, thiophenyl, N-hydroxyphthalimid, N-hydroxysuccinimid, N-hydroxyglutarimid, N-hydroxybenzamid og 1-hydroxytriazol. Andre egnede midler er fx. omhandlet i "Protective Groups in Organic Chemistry", J.F.W. McOmie, ed., omtalt ovenfor. De nedenfor givne udførelseseksempler anvender almindeligvis N-hydroxysuccinimid eller 1-hydroxybenzotriazol.

Andre aktiveringsmetoder, såsom den blandede eller symmetriske anhydridmetode, syrechloridmetoden og azidmetoden er velkendte inden for denne teknik og beskrevet i fx. Bodanszky, et al., "Peptide Synthesis", 2. udgave, 1976, pp 85-128. Disse andre metoder kan også anvendes.

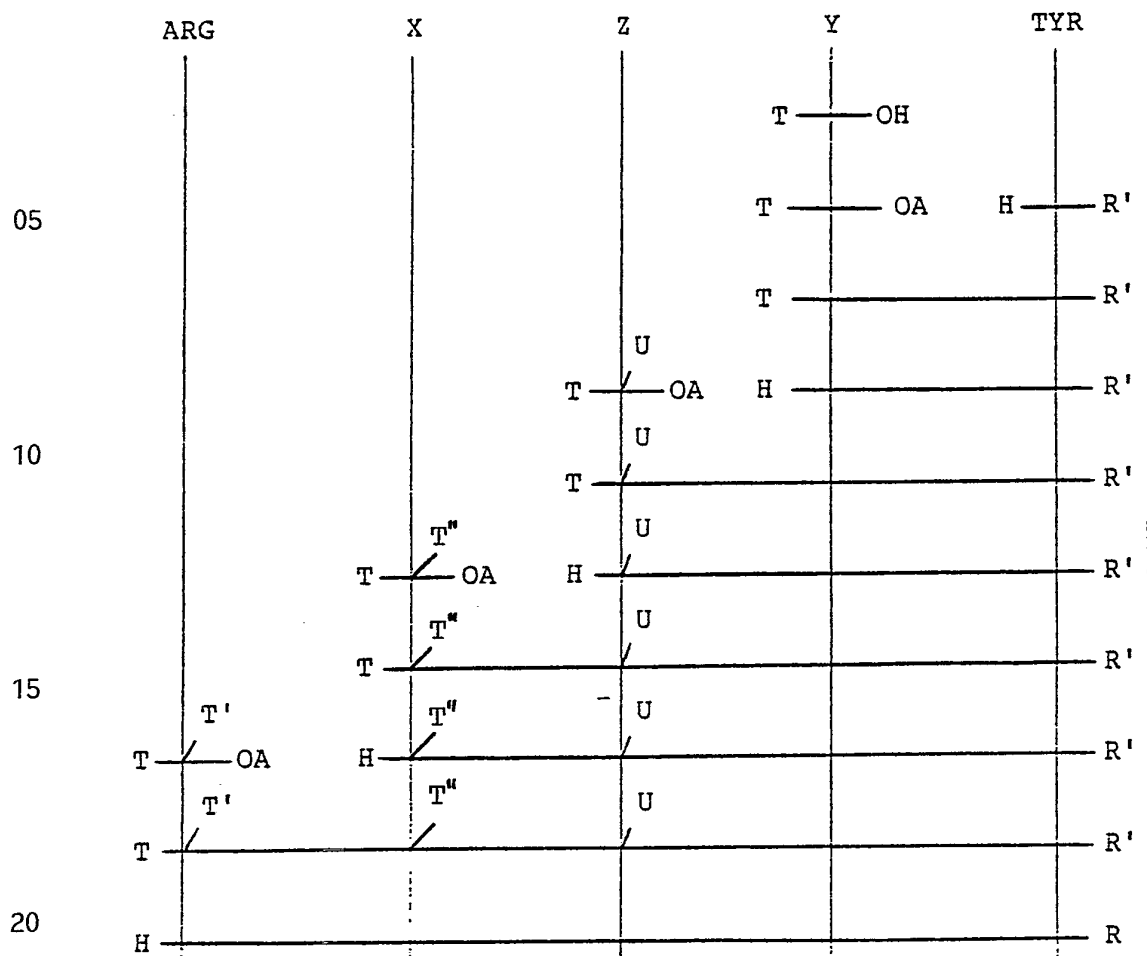
For bekvemmelighedens skyld anvendes heri følgende forkortelser, som refererer til de forskellige aminosyrer:

<u>Aminosyre</u>	<u>Forkortelse</u>
L-lysin	LYS
L-valin	VAL
L-tyrosin	TYR
L-asparaginsyre	ASP
Sarcosin	SAR
L-arginin	ARG

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er vist skematisk i nedenstående skema:

30

35



I ovenstående skema har de beskyttende grupper U, T, T' og T'' de ovenfor omtalte betydninger. Carboxyaktiveringen af aminosyreresterne er angivet ved bogstaverne OA.

Isoleringen og rensningen af det resulterende urene produkt kan udføres ved en kombination af krystallisation og ionbytningskromatografi (fortrinsvis under anvendelse af ammoniumacetat-pH5 som elueringsmiddel) under anvendelse af tyndtlagskromatografi til at bestemme identiteten af materialerne i hver fraktion. Også andre isolerings- og rensningsmetoder end de i eksemplet angivne vil kunne anvendes.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere i det efterfølgende eksempel.

Fremstilling af Arg-Lys-Asp-Val-Tyr

Boc-valin (650 g) kobledes med Tyr-OBzl (TSOH) (1273 g) i

ethylacetat, idet der anvendtes ethylchlorformiat med N-methylmorpholin ved -15°C i 2 timer til dannelse af 1202 g af dipeptidet Boc-Val-Tyr-OBzl, smp. 142 til 143°C . Dette svarer til et udbytte på ca. 60%.

- 05 Boc-Val-Tyr-OBzl (100,6 g) behandledes med trifluoreddikesyre (200 ml) ved 0°C i 1 time. 900 ml dibutylether tilsattes, og det faste salt fjernedes ved filtrering, hvilket gav 93,8 g produkt (95%), smp. 187 til 188°C .

- 10 TFA-Val-Tyr-OBzl (10 g) fra det foregående trin kobledes til Boc- β -Bzl-Asp (6,95 g) i ethylacetat/DMF med isobutylchlorformiat og N-methylmorpholin. Koblingen udførtes i 2 timer ved -15°C . Vask med vand, tørring og inddampning gav et fast stof, som krystalliseredes, hvorved der opnåedes 11,8 g (85%) af tripeptidet Boc- β -Bzl-Asp-Val-Tyr-OBzl, smp. 171 til 172°C .

- 15 Boc- β -Bzl-Asp-Val-Tyr-OBzl (9,7 g) opløstes i 20 ml trifluoreddikesyre og omrørtes ved 0°C i 2 timer. 40 ml dibutylether tilsattes dråbevis under omrøring efterfulgt af 40 ml hexan. Det faste stof fjernedes ved filtrering og vaskedes med 70 ml hexan/dibutylether 1:1, hvorved der opnåedes 9,86 g (100%) TFA- β -Bzl-Asp-Val-Tyr-OBzl, smp. 163°C .

- 20 Saltet af tripeptidet (310 g) kobledes med Boc-Cbz-lysin (174 g) i ethylacetat/DMF, idet der anvendtes isobutylchlorformiat og N-methylmorpholin ved -15°C . Reaktionsblandingen vaskedes med vand og mættet NaHCO_3 . Ethylacetatopløsningen tørredes ved azeotrop destillation, indtil der ikke længere fjernedes vand. Kølning til 3°C gav krystallisation. Det faste stof fjernedes ved centrifugering og tørredes i $1\frac{1}{2}$ time ved 70°C på et tørreanlæg med fluidiseret leje, hvorved der opnåedes 346 g (82,1%) af tetrapeptidet Boc-Cbz-Lys- β -Bzl-Asp-Val-Tyr-OBzl, smp. 161 til 163°C .

- 30 Ovenstående tetrapeptid (5 g) opløstes i 25 ml TFA i et is/vandbad og omrørtes i 2 timer. 70 ml diethylether tilsattes, og blandingen omrørtes ved 0°C i 1 time. Det faste stof fjernedes ved filtrering og tørredes ved 50°C under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 4,76 g (94%) TFA-Cbz-Lys- β -Bzl-Asp-Val-Tyr-OBzl, smp. 168 til 172°C .

- 35 Cbz-Arg(HCl) (0,03 mol) kobledes til saltet af tetrapeptidet (0,0286 mol) i DMA/ethylacetat, idet der anvendtes isobutylchlorfor-

miat og N-methylmorpholin ved -5 til -10°C i 60 minutter. Udfældning af reaktionsblandingen i vand efterfulgt af krystallisationer fra DMA/EtOAc/heptan gav 31,64 g (0,0272 mol, 95%) Cbz-Arg(HCl)-Cbz-Lys-β-Bzl-Asp-Val-Tyr-OBzl.

- 05 1,92 g (1,65 mmol) af det beskyttede tetrapeptid opløstes i 18 ml eddikesyre og 2 ml vand. 300 mg 10% Pd/c tilsattes, og blandingen rystedes under et hydrogentryk på 345 kPa (50 psi) i 24 timer ved omgivelsestemperatur. Reaktionsblandingen filtreredes og lyofiliseredes, hvorved der opnåedes 1,77 g. Aminosyreanalyse gav
10 et peptidindhold på 82% svarende til et udbytte på 88%. HPLC-analyse viste en renhed på 99%.

Det samlede udbytte af ovenstående otte trin var 46,4%, hvilket er overraskende godt i sammenligning med den konventionelle såkaldte "4 plus 1 metode" til opløsningssyntese af peptider.

- 15 Hvis enhederne i pentapeptidet nummereres som følger:

Arg-Lys-Asp-Val-Tyr

1 2 3 4 5

- 20 kan fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres som følger:

- 4+5 → (4-5)
3+(4-5) → (3-4-5)
2+(3-4-5) → (2-3-4-5)
25 1+(2-3-4-5) → (1-2-3-4-5)

"4 plus 1 metoden" forløber som følger:

- 3+4 → (3-4)
30 2+(3-4) → (2-3-4)
1+(2-3-4) → (1-2-3-4)
(1-2-3-4)+5 → (1-2-3-4-5)

- 35 Denne konventionelle "4 plus 1 metode" giver et samlet udbytte på 6,4% for syv trin. På forhånd måtte de to fremgangsmåder forventes at give omtrent samme udbytte, og det er derfor fuldstændig overraskende, at fremgangsmåden ifølge opfindelsen med sine otte

trin giver et samlet udbytte, der er næsten 10 gange så højt som det udbytte, der opnås med den konventionelle syvtrinsfremgangsmåde. Dertil kommer, at fremgangsmåden ifølge opfindelsen i det sidste trin giver et udbytte på 88%, mens den kendte fremgangsmåde kun giver et udbytte på 23% i det sidste trin.

10

15

20

25

30

35

PATENTKRAV

Fremgangsmåde til fremstilling af pentapeptidet H-ARG-X-ASP-Y-TYR-R, hvori X er LYS og Y er VAL, eller X og Y begge er SAR, og R er OH eller NH_2 , ved opløsningssyntese KENDETEGNET ved, at man

a) danner fragment I, som består af H-Y-TYR-R', hvori R' er OH eller NH_2 , ved

- i) beskyttelse af α -aminogruppen af Y-aminosyren ved at lade den reagere med et reagens, som vil indføre den beskyttende gruppe T,
- ii) aktivering af den i trin i) dannede, beskyttede Y med hensyn til nukleofilt angreb ved carboxygruppen af en amin, til dannelse af en carboxyaktiveret, beskyttet Y-aminosyre,
- iii) omsætning af den carboxyaktiverede beskyttede Y med TYR-R', og
- iv) fjernelse af den beskyttende gruppe T,

b) danner fragment IV, som består af alfa-T-omega-U-ASP-Y-TYR-R', ved

- i) beskyttelse af alfa-amino- og omega-carboxygrupperne af asparaginsyre ved at lade den reagere med reagenser, som vil indføre de beskyttende grupper T og U,
- ii) aktivering af den i trin i) dannede, beskyttede ASP med hensyn til nukleofilt angreb ved alfa-carboxygruppen af en amin, til dannelse af carboxy-aktiveret, beskyttet asparaginsyre, og
- iii) omsætning af den carboxyaktiverede, beskyttede asparaginsyre med fragment I,

c) danner fragment IVA, som består af H-omega-U-ASP-Y-TYR-R', ved fjernelse af den beskyttende gruppe T fra fragment IV,

d) danner fragment III, som består af alfa-T-epsilon-T''-X-omega-U-ASP-Y-TYR-R', ved

- i) beskyttelse af alfa-aminogruppen og, hvis X er LYS, af epsilon-aminogruppen af X-aminosyren ved at lade den reagere med et eller flere reagenser, som indfører den/de beskyttende gruppe(r) T (og T''),
- ii) aktivering af den i trin i) dannede, beskyttede X med hensyn til nukleofilt angreb ved carboxygruppen af en amin, til dannelse af en carboxyaktiveret, beskyttet X-aminosyre, og
- iii) omsætning af den carboxyaktiverede beskyttede X-amino syre med fragment IVA, hvorved fragment III dannes,

e) fjerner den beskyttende gruppe T fra fragment III til dannelse af fragment IIIA, som består af H-epsilon-T''-X-omega-U-ASP-Y-TYR-R',

f) fremstiller alfa-T-omega-T'-ARG, hvori T er en beskyttende gruppe på alfa-aminogruppen af L-argininen, og T' er en beskyttende gruppe på guanidinogruppen af L-argininen, og aktiverer den med hensyn til nukleofilt angreb ved carboxygruppen af en amin,

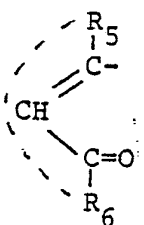
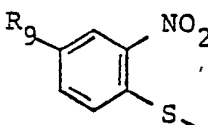
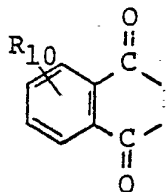
g) omsætter fragment IIIA med den carboxyaktiverede alfa-T-omega-T'-ARG til dannelse af alfa-T-omega-T'-ARG-epsilon-T''-X-omega-U-ASP-Y-TYR-R',

h) fjerner U, T, T' og T'' grupperne til dannelse af peptidet H-ARG-X-ASP-Y-TYR-R, og

j) isolerer og renser det resulterende peptid,

hvori T og, når X er LYS, T'' hver er en gruppe udvalgt fra gruppen bestående af

- a) $R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$, hvori R_1 betegner phenyl, tolyl, xylyl, adamantyl, allyl, β -cyanoethyl, fluorenylmethyl, benzyl, benzyl, hvori phenylringen er subsitueret med fra 1-3 substituentter udvalgt blandt halogen, nitro, lavere alkyl og lavere alkoxy, diisopropylmethyl, diphenylmethyl, cyclohexyl, cyclopentyl, vinyl, t-butyl, t-amyl, dimethyltrifluormethylmethyl eller dimethylbiphenylmethyl,

- b) $\text{R}_2\text{C}(=\text{O})-$, hvori R_2 betegner lavere alkyl med 2-4 carbonatomer eller lavere alkyl med 1-4 carbonatomer substitueret med fra 1-5 halogengrupper,
- c) $\text{R}_3\text{O}-\text{P}(=\text{V})(\text{OR}_4)-$, hvori V betegner S eller O, og R_3 og R_4 hver betegner benzyl eller lavere alkyl,
- d)  hvori R_5 og R_6 hver for sig betegner lavere alkyl eller tilsammen betyder $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{R}_7)(\text{R}_8)-\text{CH}_2-$, hvori R_7 og R_8 hver for sig betegner hydrogen eller lavere alkyl,
- e)  hvori R_9 betegner hydrogen eller nitro, og
- f)  hvori R_{10} betegner hydrogen, methyl, halogen eller nitro,

under den forudsætning, at T er monodentat, når X og Y er SAR, og T'' er hydrogen, når X er SAR, og U er benzyl eller benzyl, hvori phenylgruppen er substitueret med fra 1-3 substituenten hver udvalgt blandt halogen, nitro, C_{1-3} alkyl og C_{1-3} alkoxy, og T' er en

gruppe udvalgt blandt $\text{R}_1-\text{OC}(=\text{O})-$, hvori R_1 er som defineret ovenfor, nitro, hydrochlorid, p-methoxybenzylsulfonyl og tosyl.