(19) DANMARK

PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 151341 B

(21) Patentansøgning nr.: 0093/82

(51) Int.Cl.[4] C 07 K 5/06

(22) Indleveringsdag: 12 jan 1982

(41) Alm. tilgængelig: 14 jul 1982

(44) Fremlagt: 23 nov 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 13 jan 1981 HU 0070/81

(71) Ansøger: *RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR R.T.; Gyoemroei ut 19-21; Budapest X, HU

(72) Opfinder: Sandor *Bajusz; HU, Erzsebet *Szell; HU, Eva *Barabas; HU, Daniel *Bagdy; HU

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat

(56) Fremdragne publikationer

———

(57) Sammendrag:

93-82

D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat fremstilles ud fra D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydhemisulfat eller D-phenylalanyl-L-prolyl-N^G-carboxy-L-argininaldehyd indeholdende en syrefølsom beskyttelsesgruppe på sin aminoendegruppe, fortrinsvis en t-butyloxycarbonylgruppe, ved at aminobeskyttelsesgruppen og eventuelt N^G-carboxygruppen fjernes med 1-12 ækvivalentmængder 1-12 N svovlsyre, hvorefter det fri tripeptidaldehydsulfat isoleres.

Det således fremstillede salt er særdeles stabilt i vandig opløsning og udviser antikoagulantvirkning.

DK 151341 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendt D-phenylalanyl--L-prolyl-L-argininaldehydsulfat, som er særdeles stabilt i vandig opløsning.

Det er kendt at heparin, polyanioner af beslægtet struktur (heparinoider) og coumarinderivater for tiden er mest anvendt i antikoagulantterapien. Det er et fællestræk for disse midler, at de ikke fremkalder direkte hæmning af den proteolytiske omsætning, som udløser blodstørkning. Heparin som katalysator fremskynder hæmningsvirkningen af én af plasmainhibitorerne, antithrombin III, på enzymerne i koagulationsprocessen, fortrinsvis på thrombin, medens coumarinderivater hæmmer biosyntesen af proteiner indeholdende γ-carboxy-glutaminsyre(Gla)-dele. Der er 4 proteiner af denne type, som er involveret i blodkoagulationsprocessen, og ét af dem er prothrombin. Blodkoagulationsfaktorer, som har ingen eller mindre end det normale antal Gla-rester, er inaktive og medvirker ikke i koagulationsprocessen. Det bør imidlertid noteres, at denne hæmning dækker syntesen af hele området af Gla--holdige proteiner, dvs. at én af de naturligt forekommende inhibitorer i koagulationsprocessen, protein C (eller faktor XVI) syntetiseres også i inaktiv form i nærværelse af coumarinderivater, hvilket er temmelig ufordelagtigt. Det er også karakteristisk, at heparin primært indgives ved i.v. infusion, idet det faktisk er inaktivt ved oral indgivelse, medens coumarinderivater kun kan indgives oralt. Som følge deraf kan virkningen af heparin registreres hurtigt, i løbet af kort tid, medens virkningen af coumarinderivater, som er synteseinhibitorer, kun kan registreres efter 24-36 timer.

Endvidere er det kendt, at der er tripeptidaldehyder, som også udviser antikoagulantaktivitet; i modsætning til ovennævnte midler går disse imidlertid i direkte omsætning med thrombin, idet de hæmmer dets proteolytiske omsætninger, selv i fraværelse af antithrombin III. Både

D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydacetat, beskrevet i HU-PS nr. 169.870, og D-phenylalanyl-L-prolyl-N^G-carboxy--L-argininaldehyd, beskrevet i BE-PS nr. 880.844, er kraftige thrombininhibitorer.

Det har vist sig, at antithrombinstyrken af ovennævnte syntetiske argininpeptidaldehydsalte, især af forbindelser med en fri N-terminal aminogruppe, dvs. D-phenylalanyl-L--propyl-L-argininaldehydacetat og -hydrochlorid, varierer og falder hurtigt ved henstand i vandig opløsning, hvilket gør terapeutisk anvendelse umulig. Selv om N^G-carboxyderivatet af de frie tripeptidaldehyder, dvs. D-phenylalanyl--L-prolyl-N^G-carboxy-L-argininaldehyd bibeholder sin aktivitet i en vandig pufferopløsning i 20-24 timer, er der efter nogle dage imidlertid allerede en signifikant reduktion i styrken, og efter adskillige måneder er der selv i fast form et tab af oprindelig aktivitet.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt salt af D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehyd, nemlig sulfatet, som i modsætning til hidtil kendte produkter også er stabilt i vandig opløsning.

Det har vist sig, at stabiliteten af forskellige salte af D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginaldehyd i signifikant grad varierer i vandig opløsning, dvs. isotonisk saltopløsning. Under de her omhandlede forsøg er peptiderne blevet opløst i koncentrationer på 10 mg/ml, opbevaret ved 5°C og den påfølgende ændring i den antithrombine aktivitet registreret i 180 dage. Styrken undersøges i et system indeholdende følgende komponenter:

0,2 ml 0,5%'s fibrinogen fra kvæg i en 0,9%'s opløsning af natriumchlorid,

0,1 ml tris-(hydroxymethyl)-amino-methanhydrochlorid--saltsyrepuffer (pH-værdi 7,2) indeholdende peptidopløsningen,

0,1 ml US Standard Human Thrombin (NIH, Bethesda, Maryland, USA), 10 enheder/ml opløsning.

Thrombintiden for det peptidfrie system er 15 sek., målt på "Schnither-Gross Coagulometer".

Aktiviteten af tripeptidaldehydopløsningen sættes arbitrært til 100, hvis reaktionsblandingen fremkalder en fem gange så stor thrombintid, dvs. 75 sek., ved en slutkoncentration på $3,5 \times 10^{-7}$ M, hvilket i tilfældet med tripeptidaldehydsulfatet svarer til 0,175 µg/ml.

Forsøgsdata er opsummeret i tabel I. Det et tydeligt, at medens aktiviteten af det tilsvarende hydrochlorid i isotonisk saltopløsning begynder at falde efter 5 dage, og aktiviteten af acetat, citrat, tartrat og tosylat allerede falder efter nogle dage, i lighed med N^G-carboxyderivatet af det fri tripeptidaldehyd, som har beslægtede egenskaber, bibeholder D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat sin antitrombinaktivitet i 90 dage. I stabilitetsundersøgelser over længere tid viser D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat sig at være stabilt i 180 dage i vandigt medium, og i fast form holder det sin aktivitet i 6 måneder.

Tabel I

Antithrombinaktivitet af tripeptidaldehydsalte i en isotonisk saltopløsning.

Peptidaldehyd[a]	Relativ aktivitet[b] efter 0 dage	5	10	15	20	40	90
D-Phe-Pro-Arg-H,2 CH_3COOH[cd]	70-50	60-40	40-30	40-30	40-30	35-25	30-20
D-Phe-Pro-Arg-H,2 HCl[c]	90-60	90-60	80-50	70-40	60-40	50-30	40-30
D-Phe-Pro-Arg(COOH)-H[e]	100	80	60	50	30	25	20
D-Phe-Pro-Arg-H,H_2SO_4[f]	100	100	100	100	100	100	100

151341

a. De anvendte forkortelser er i overensstemmelse med dem, der er fastlagt i litteraturen (dvs. J. Biol. Chem. 247, 977 (1972)), hvori Z står for benzyloxycarbonyl, og Arg (COOH) og Arg(Z) står for henholdsvis N^G-carboxy- og N^G-benzyloxycarbonyl-L-argininingrupper.

b. Det peptidaldehyd, der fremkalder en thrombintid på 75 sek. ved en slutkoncentration på $3,5 \times 10^{-7}$ M i reaktionsblandingen, har en relativ antithrombinaktivitet på 100.

c. Et produkt, der er opnået ved hydrogenolyse af Z-D-Phe-Pro-Arg(Z)-H-i nærværelse af en mængde på ét ækvivalent af saltsyre.

d. Antithrombinaktiviteten af det tilsvarende citrat, tartrat og tosylat ændrer sig i lighed med aktiviteten af acetatet.

e. Et produkt, der er syntetiseret ifølge fremgangsmåden beskrevet i BE-PS nr. 880.844.

f. Et produkt, der er fremstillet ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse.

For at simulere fysiologiske forhold afprøves antithrombinaktiviteten af tripeptidaldehydsaltene og carbaminsyrederivaterne også på humant plasma i følgende system:

0,2 ml humant citratplasma,

0,1 ml tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid--saltsyrepufferopløsning (pH-værdi 7,2) indeholdende peptidopløsningen, og

0,1 ml US Standard Human Thrombin (NIH, Bethesda Maryland, USA) 10 enheder/ml opløsning.

Thrombintiden af det peptidfri system er 15 sek., målt i et "Schnither-Gross Coagulometer".

Tabel II

Antithrombinaktivitet af tripeptidaldehydderivater i humant plasma.

Peptidaldehyd	Mængde af peptid (µg/ml+), som er nødvendig for at forforøge thrombintiden 2 gange umiddelbart efter opløsning af peptidet	Relativ aktivitet
D-Phe-Pro-Arg-H,H_2SO_4	0,020	100
D-Phe-Pro-Arg(COOH)-H	0,042	45
D-Phe-Pro-Arg-H,2 CH_3COOH	0,065 - 0,140	35-14
D-Phe-Pro-Arg-H,2 HCl	0,060 - 0,130	33-15
Heparin[a]	0,105	19

a. Værdi målt med gængst heparin (132,2 U/mg, U.S. Pharmacopoeia (U.S.P.) XVII).

+. Mængde af peptid i reaktionsblandingen.

Data i tabel II viser tydeligt, at den mængde peptid, der er nødvendig til opnåelse af en stigning i thrombintiden, som er to gange så stor som for kontrolgruppen, varierer afhængigt af den portion, der anvendes i tilfælde af acetat- og hydrochloridsaltene, og er mange gange større - i tilfælde af carbaminsyrederivatet dobbelt så stor som den mængde, der kræves af tripeptidaldehydsulfatet.

In vivo-forsøget med tripeptidaldehydderivaterne er opsummeret i tabel III. D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat har en signifikant styrke in vivo. Ved intravenøs og subkutan indgivelse er virkningen i samme område som for heparin, som er almindeligt anvendt i terapien, det har imidlertid store fordele sammenlignet med heparin. Medens heparin, indgivet oralt, er inaktivt, kan der opnås terapeutisk virkning med tripeptidaldehydsulfatet i orale doser på 25 mg/kg (men kun med 50 mg/kg-doser af carbaminsyrederivatet).

Tabel III

In vivo-forsøg

Nødvendig dosis til opnåelse af terapeutisk virkning[a]

Peptidaldehyd	mg/kg/time i.v. infusion		mg/kg s.c.		mg/kg p.o.	
	kanin	hund	kanin	hund	kanin	hund
D-Phe-Pro-Arg-H,2 CH_3COOH	-	-	-	-	100	100
D-Phe-Pro-Arg-H,2 HCl	-	-	-	-	-	100
D-Phe-Pro-Arg-(COOH)-H-	-	3,0	10,0	6,0	50	50
D-Phe-Pro-Arg--H,H_2SO_4	1,0	0,5	6,0	6,0	25	25
Heparin	0,6	0,5	5,0	2,0	-	-

a. Den terapeutiske virkning er karakteriseret ved den dosis, der er nødvendig til forlængelse af thrombintiden i blodet 1,5-2,5 gange (A.S. Nies (1978), Clinical Pharmacology, K.L. Melmon & F.F. Morrelli, Eds., 2. udgave, side 303-306, Macmillan Publ. Co. Inc. New York; og M. Versraeta & R. Verwilghen (1980) Drug Treatment, Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2. udgave, G.S. Avery Ed. (1980), side 889-952, Edinburgh og London).

Toksicitetsdata for D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat er også gunstigere end dem for enten acetat eller carbaminsyrederivat. De akutte toksicitetsdata er opsummeret i tabel IV og er i tilfælde af tripeptidaldehydsulfat 2 g/kg ved oral indgivelse.

Tabel IV

Akut toksicitetsdata på mus

Peptidaldehyd	LD_{50} mg/kg i.v. pille	i.p.	s.c.	p.o.
D-Phe-Pro-Arg-H,$2CH_3COOH$	9	38	-	960
D-Phe-Pro-Arg(COOH)-H[a]	-	-	-	1200
D-Phe-Pro-Arg-H,H_2SO_4	45[b]	230	1800	2000
Heparin	ingen tilgængelige litteraturdata			

a. På grund af dårlig opløselighed er de toksicitetsdata, der er opnået ved andre indgivelser end p.o., temmelig usikre.

b. Ved intravenøs infusion andrager LD_{50} 58 mg/kg på kaniner.

I betragtning af den lave toksicitet og den høje styrke af D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat er det terapeutiske index, som medregner begge, og som er den mest karakteristiske indikator for den terapeutiske værdi i et lægemiddel, meget gunstigere end for de kendte tripeptidaldehydderivater.

På grundlag af de intravenøse infusionsforsøg på hunde fastlægges dosen af den humane intravenøse infusion til 1-2 mg/kg/time.

Det har vist sig at D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat kan fremstilles ved hjælp af en kendt metode, ved at underkaste benzyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L--prolyl-N^G-benzyloxycarbonyl-L-argininaldehyd (Z-D-Phe-Pro--Arg(Z)-H) hydrogenolyse i nærværelse af ækvivalente mængder svovlsyre. Endvidere kan det let fremstilles i tilstrækkelig renhed ud fra sit syreføIsomme derivat indeholdende en triphenylmethyl- eller t-alkyloxycarbonylbeskyttelsesgruppe, dvs. ud fra t-butyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-propyl-L--argininaldehydhemisulfat eller t-butyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolyl-N^G-carboxy-L-argininaldehyd, med 1 til 12 N svovlsyre. På samme tid kunne de følgende, kendte metoder ikke tilvejebringe tilfredsstillende resultater:

a. Acidolyse af t-butyloxycarbonylgruppen med svovlsyre opløst i eddikesyre
(Beyerman et al. i Peptides, 1970 (Ed.: H. Nesvadba), side 138, North Holland, Amsterdam, 1973).

b. Direkte omdannelse af D-Phe-Pro-Arg(COOH)-H-carbaminsyrederivat ifølge BE-PS nr. 880.844 med svovlsyre til det ubeskyttede tripeptidaldehydsulfat.

c. Overførsel af forskellige andre ubeskyttede tripeptidaldehydsalte, dvs. af D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydacetat ifølge HU-PS nr. 169.870, i dets sulfat enten med en ionbytterharpiks eller med svovlsyre.

De produkter, der opnås med én af metoderne a til c, viser sig at have dårlig homogenitet og/eller stabilitet i vandig opløsning.

Baseret på ovennævnte angår den foreliggende opfindelse en analogifremgangsmåde til fremstilling af D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat ud fra D-phenylalanyl--L-prolyl-L-argininaldehydhemisulfat eller D-phenylalanyl--L-prolyl-N^G-carboxy-L-argininaldehyd begge indeholdende en syreføl som beskyttelsesgruppe på de N-terminale aminogruppe, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at den syrefølsomme aminobeskyttelsesgruppe og den eventuelle N^G-carboxygruppe fjernes med 1 til 12 N svovlsyre, anvendt i 1 til 12 ækvivalentmængder, og at det resulterende fri tripeptidaldehydsulfat isoleres.

Produktet, der fremstilles på denne måde, kan eventuelt indeholde 4 til 6% calciumsulfat, hvilket imidlertid hverken påvirker dets biologiske aktivitet eller dets terapeutiske anvendelse.

Førstnævnte udgangsforbindelse kan fremstilles, ved at L-argininlactam, som er beskyttet ved sin guanidinogruppe med en benzyloxycarbonylgruppe, kondenseres med t-butyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolin, den resulterende blokerede tripeptidlactam reduceres, og benzyloxycarbonylgruppen på guanidinogruppen i det opnåede beskyttede tripeptidaldehyd underkastes hydrogenolyse i ethanol eller tetrahydrofuran indeholdende 30-40% vand i nærværelse af en ækvivalent mængde svovlsyre. Ved en foretrukket udførelsesform opløses det resulterende tripeptidaldehydhemisulfat, som stadig er beskyttet ved sin N-terminale aminogruppe, i 8 til 12 ækvivalenter, fortrinsvis 10 ækvivalenter, 4 til 6 N, fortrinsvis 5 N, svovlsyre og opvarmes i 20 til 40 minutter, fortrinsvis i 30 minutter, til 40 til 60°C, fortrinsvis til 50°C, derefter neutraliseres opløsningen med calciumcarbonat, filtreres og frysetørres fortrinsvis.

Den foreliggende opfindelse er yderligere belyst ved de følgende eksempler.

R_f-Værdierne i eksemplerne er bestemt ved silicagel-tyndtlagchromatografi ("Kieselgel G", Reanal, Budapest) i følgende systemer:

1. Ethylacetat:pyridin:eddikesyre:vand = 480:20:6:11

2. Ethylacetat:pyridin:eddikesyre:vand = 60:20:6:11

3. Ethylacetat:pyridin:eddikesyre:vand = 30:20:6:11.

Eksempel 1

D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat

2,74 g (5 mmol) t-butyloxycarbonyl-D-phenylalanyl--L-prolyl-L-argininaldehydhemisulfat opløses i 5 ml vand, 5 ml 10 N svovlsyre tilsættes under konstant omrøring, og blandingen opvarmes til 50°C. Opløsningen omrøres i 15 minutter ved 50°C, derefter fortyndes den med 25 ml isvand, og pH-værdien indstilles på 6,5 med ca. 2,25 g calciumcarbonat under isafkøling. Det udfældede calciumsulfat frafiltreres og vaskes to gange med 5 ml vand. Filtratet ekstraheres to gange med 10 ml n-butanol, koncentreres til ca. 30 ml, filtreres om nødvendigt og frysetørres. Udbytte: 2,25 g (79%) af titelproduktet indeholdende 4,8% calciumsulfat.

R_f = 0,35 til 0,40.

$[\alpha]_D^{20} = -117 \pm 1^o$ (c = 1, vand).

Analyse for $C_{20}H_{30}O_3N_6, H_2SO_4, 3\ H_3O, 0,2\ CaSO_4$ (565,85):

Beregnet: C: 42,45%, H: 6,77%, N: 14,85%, SO_4: 20,37%, Ca: 1,41%, H_2O: 9,55%.

Fundet: C: 42,2%, H: 6,9%, N: 14,85%, SO_4: 19,8%, Ca: 1,3%, H_2O: 9,75%.

Udgangsmaterialerne syntetiseres ifølge følgende fremgangsmåde:

Trin 1: t-Butyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolyl-N^G-benzyloxycarbonyl-L-argininlactam

8,6 g (22 mmol) t-butyloxycarbonyl-N^G-benzyloxycarbonyl-L-argininlactam (BE-PS nr. 880.844) suspenderes i 20 ml ethylacetat, og ved 5°C og under konstant omrøring tilsættes en opløsning af 4 M saltsyre i 40 ml ethylacetat. Reaktionsblandingen omrøres i 30 minutter under isafkøling, fortyndes med 100 ml ethylacetat, det dannede bundfald frafiltreres, vaskes med ethylacetat og tørres under formindsket tryk i en ekssikkator over kaliumhydroxid. Det resulterende N^G-benzyloxycarbonyl-L-argininlactamhydrochlorid opløses i 20 ml dimethylformamid, og 6,2 ml (44 mmol) triethylamin tilsættes ved -10°C. Den dannede suspension sættes til det efterfølgende blandede anhydrid.

7,25 g (20 mmol) t-butyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolin (U. Ludescher & R. Schwyzer: Helv Chim. Acta 55, 2052 (1972)) og 2,22 ml (20 mmol) N-methylmorpholin opløses i 20 ml dimethylformamid. Opløsningen afkøles til -15°C, 2,64 ml (20 mmol) chlormyresyreisobutylester tilsættes under omrøring og efter 5 minutter tilsættes ovennævnte dimethylformamidopløsning. Omrøringen fortsætter i 1 time ved -15°C og i 1 time ved 0°C, derefter fortyndes reaktionsblandingen med 30 ml benzen, de udfældede salte frafiltreres og vaskes to gange med 10 ml benzen. Opløsningen af benzen-dimethylformamid fortyndes med 50 ml vand, og faserne adskilles. Det vandige lag ekstraheres to gange med 10 ml benzen, derefter vaskes de kombinerede benzenekstrakter 3 gange med en opløsning af 30 ml 10%'s natriumcarbonat, 30 ml vand, 3 gange med 30 ml 0,5 N svovlsyre, 2 gange med 30 ml vand, og opløsningen inddampes ved formindsket tryk efterfulgt af tørring over vandfrit natriumsulfat. Inddampningsremanensen homogeniseres med petroleumsether, filtreres, vaskes med petroleumsether og lufttørres. Udbytte: 9,65 g (76%) af titelproduktet.

R_f = 0,81 til 0,89.

Trin 2: t-Butyloxycarbonyl-D-phenylaldehyd-L-prolyl-N^G-benzyloxycarbonyl-L-argininaldehyd

9,52 g (15 mmol) tripeptidlactam (trin 1) opløses i 45 ml tetrahydrofuran, og ved -20°C og under kraftig omrøring tilsættes 11,25 mmol lithiumaluminiumhydrid i tetrahydrofuran (ca. 28 ml af en 0,4 M opløsning). Reduktionens fremskriden kontrolleres ved tyndtlagchromatografi (R_f^1 = 0,71 til 0,77 (lactam) og R_f^1 = 0,31 til 0,39 (aldehyd)). Om nødvendigt kan en yderligere portion af hydridopløsningen tilsættes. Når omsætningen er afsluttet, syrnes tetrahydrofuranopløsningen forsigtigt med 0,5 N svovlsyre til pH-værdi 3, fortyndes derefter, således at der ikke sker nogen udfældning (ca. 100 ml). Den vandige tetrahydrofuranopløsning ekstraheres 3 gange med 75 ml methylenchlorid, og de kombinerede methylenchloridekstrakter vaskes 3 gange med en opløsning af 10 ml 10%'s natriumcarbonat, derefter 2 gange med 10 ml vand. Methylenchloridopløsningen tørres derefter over vandfrit natriumsulfat og inddampes under formindsket tryk. Inddampningsremanensen opløses i 50 ml benzen, og opløsningen inddampes gentagne gange under formindsket tryk. Derefter gentages opløsning og inddampning endnu én gang. Inddampningsremanensen oparbejdes med ether, filtreres, vaskes med diethylether og lufttørres. Udbytte: 6,9 g (72%) af titelproduktet.

R_f^1 = 0,3 til 0,4.

Trin 3: t-Butyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydhemisulfat

6,4 g (10 mmol) beskyttet tripeptidaldehyd (trin 2) opløses i en blanding af 50 ml vand, 50 ml tetrahydrofuran og 10 ml 1 N svovlsyre og underkastes hydrogenolyse i nærværelse af 1 g af en 10%'s palladium-på-kul-katalysator. Omsætningens fremskriden kontrolleres ved tyndtlagchromatografi [(R_f^2 = 0,95 til 1,0 (tripeptidaldehyd beskyttet ved sin guanidinogruppe) og R_f^2 = 0,45 til 0,54 (ubeskyttet

tripeptidaldehyd). Efter at omsætningen er afsluttet, frafiltreres katalysatoren, vaskes med 30 ml af en 50%'s vandig tetrahydrofuranopløsning, og de kombinerede filtrater koncentreres til ca. 60 ml under formindsket tryk. Remanensen ekstraheres 4 gange med n-butanol. n-Butanollagene kombineres og inddampes til tørhed under formindsket tryk. Inddampningsremanensen oparbejdes med en blanding af diethylether og diisopropylether (1:1), filtreres, vaskes med ovennævnte opløsning og tørres derefter under formindsket tryk i en ekssikkator. Udbytte: 4,4 g (80%) af titelforbindelsen.

R_f^2 = 0,45 til 0,54.

$[\alpha]_D^{20} = -65 \pm 1^o$ (c = 1, vand).

Analyse for $C_{25}H_{38}O_5N_6.0,5\ H_2SO_4$ (551,64):

Beregnet: C: 54,43%, H: 7,13%, N: 15,23%, SO_4: 8,71%.

Fundet: C: 54,5%, H: 7,3%, N: 15,2%, SO_4: 8,7%.

Eksempel 2

D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat

2,85 g (5 mmol) t-butyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolyl-N^G-carboxy-L-argininaldehyd opløses i 5 ml vand, der tilsættes 5 ml 10 N svovlsyre, og der opvarmes til 50°C. Opløsningen omrøres i 15 minutter ved 50°C, fortyndes derefter med 25 ml isvand, og pH-værdien indstilles på 6,5 med ca. 1,6 g fast calciumhydroxid under isafkøling. Det udfældede calciumsulfat frafiltreres og vaskes 2 gange med 5 ml vand. Filtretet ekstraheres med 10 ml n-butanol, koncentreres til ca. 30 ml under formindsket tryk, filtreres om nødvendigt og frysetørres derpå. Udbytte: 2,3 g (81%) af titelforbindelsen indeholdende 4,9% calciumsulfat.

R_f^3 = 0,35 til 0,40.

$[\alpha]_D^{20} = -117 \pm 1^o$ (c = 1, vand).

Udgangsmaterialet fremstilles ifølge følgende fremgangsmåde:

6,4 g (10 mmol) t-butyloxycarbonyl-D-phenylalanyl-L-prolyl-N^G-benzyloxycarbonyl-L-argininaldehyd (eksempel 1, trin 2) opløses i 100 ml 75%'s vandig ethanol, og underkastes hydrogenolyse i nærværelse af 1 g af en 10%'s palladium-på-kul-katalysator. Omsætningens fremskriden kontrolleres ved tyndtlagchromatografi [(R_f^2 = 0,90 til 0,95 (beskyttet tripeptidaldehyd) og 0,45 til 0,55 (N^G-carboxyderivat)]. Ved afslutningen af omsætningen frafiltreres katalysatoren, vaskes med 30 ml vand, og filtratet koncentreres til 30-40 ml under formindsket tryk. Remanensen fortyndes med 100 ml vand, ekstraheres 2 gange med 20 ml methylenchlorid og frysetørres. Udbytte: 5,1 g (85%) af titelproduktet. R_f^2 = 0,45 til 0,55.

Aminosyreanalyse: Phe = 0,96; Pro = 1 (reference-aminosyre), molekylvægt ifølge aminosyreanalyse: 570.

Patentkrav.

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydsulfat ud fra D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininaldehydhemisulfat eller D-phenylalanyl-L-prolyl-N^G-carboxy-L-argininaldehyd begge indeholdende en syrefølsom beskyttelsesgruppe på den N-terminale aminogruppe, kendetegnet ved, at den syrefølsomme aminobeskyttelsesgruppe og den eventuelle N^G-carboxygruppe fjernes med 1 til 12 N svovlsyre, anvendt i 1 til 12 ækvivalentmængder, og at det resulterende fri tripeptidaldehydsulfat isoleres.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at en t-alkoxycarbonylgruppe, fortrinsvis en t-butyloxycarbonylgruppe, anvendes som den syrefølsomme beskyttelsesgruppe i udgangsmaterialet.