

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 166154 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1658/85

(51) Int.Cl.5

C 07 K 7/16

(22) Indleveringsdag: 12 apr 1985

(41) Alm. tilgængelig: 14 okt 1985

(44) Fremlagt: 15 mar 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 13 apr 1984 NL 8401187

(71) Ansøger: *AKZO N.V.; Velperweg 76; 6824 BM Arnhem, NL

(72) Opfinder: David De *Wied; NL

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

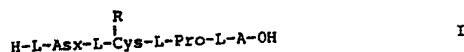
(54) Vasopressin- og oxytocin-analoge peptider og deres farmaceutisk acceptable syreadditionssalte og metalsalte, fremgangsmåde til fremstilling deraf, samt farmaceutiske præparater indeholdende disse peptider

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1658-85

Peptider med psykofarmakologiske egenskaber og med formelen:



hvor A betegner aminosyreresten Arg, Lys eller Leu og
R betegner H-L-Cys-OH eller H-L-Asx-L-Cys-L-Pro-L-A-OH,
samt de funktionelle derivater deraf.

DK 166154 B

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte vasopressin- og oxytocin-analoge peptider med psykofarmakologiske egenskaber samt farmaceutisk acceptable syreadditionssalte og metalsalte heraf, en fremgangsmåde til fremstilling af disse peptider samt et farmaceutisk præparat, der indeholder disse peptider som den aktive bestanddel.

Både oxytocin og vasopressin er peptider, der ifølge deres hormonale virkninger også beskrives som neuropeptider, nemlig som peptider, der blandt andet påvirker hukommelsesprocesser.

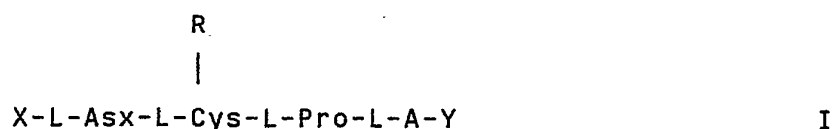
Man har nu fundet peptider, der kun besidder en del af aminosyresekvensen fra oxytocin og vasopressin, og som har en meget stærkere og mere specifik indflydelse på hukommelsesprocesser, mens de hormonale virkninger af oxytocin og vasopressin ikke længere er til stede.

Sådanne peptider, der er afledt af enten vasopressin eller oxytocin, er allerede blevet beskrevet i de hollandske patentansøgninger nr. 82/03,949 og 82/04,881, der ikke er offentliggjorte. Disse peptider har aminosyresekvensen 4-8 og 4-9 fra oxytocin og vasopressin, bortset fra, at aminosyreresten i stilling 4 er en pyroglutamylrest i stedet for en glutaminyrest, og at aminosyresekvensen i stilling 6 er cystin (Cyt).

Eftersom fragmentet 5-9 (Cyt⁶) fra oxytocin ikke var så interessant i visse hukommelsestests, har det hidtil været antaget, at aminosyren i stilling 4 udgjorde et væsentligt bidrag til nævnte virkning på hukommelsesprocesser, og at denne aminosyre derfor ikke kunne udelades.

Det har imidlertid nu overraskende vist sig, at aminosyresekvensen 5-8 (Cyt⁶) fra oxytocin og vasopressin stadig udviser en mindst lige så stærk indflydelse på hukommelsen som de ovennævnte (længere) fragmenter.

Den foreliggende opfindelse angår derfor peptider, som er ejendommelige ved den almene formel:



- 5 hvori A betegner aminosyreresten Arg, Lys eller Leu, og R be-
 tegner gruppen X-L-Cys-Y eller X-L-Asx-L-Cys-L-Pro-L-A-Y, hvor
 X er H eller acyl, hidrørende fra en alifatisk carboxylsyre,
 der har 1-6 C-atomer, og Y er OH, NH₂, NHR', NR'₂ eller OR',
 10 hvor hver R' er alkyl med 1-6 C-atomer, og deres farmaceutisk
 acceptable syreadditionssalte og metalsalte.

- Disse peptider og peptidderivater ifølge formel I fremstilles
 på en for peptider sædvanlig måde. En sædvanlig fremgangsmåde
 15 til fremstilling af de omtalte forbindelser er at koble de
 krævede aminosyrer ved hjælp af kondensation enten i den ho-
 mogene fase eller f.eks. i en såkaldt fast fase.

- Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at man
 20 kobler de krævede (om nødvendigt beskyttede) aminosyrer ved
 hjælp af kondensation enten i den homogene fase eller på en
 såkaldt fast fase, fjerner de eventuelle beskyttelsesgrupper
 og om ønsket omdanner det opnåede peptid til et andet derivat
 med formel I som defineret i krav 1.

- 25 Kondensationen i den homogene fase kan udføres som følger:

- a) kondensation af en aminosyre eller et peptid, der har en
 fri carboxylgruppe og beskyttede andre reaktive grupper, med
 30 en aminosyre eller et peptid, der har en fri aminogruppe og
 beskyttede andre reaktive grupper, i nærværelse af et kondensa-
 tionsmiddel,

b) kondensation af en aminosyre eller et peptid, der har en aktiveret carboxylgruppe og eventuelt beskyttede andre reaktive grupper, med en aminosyre eller et peptid, der har en fri aminogruppe og eventuelt beskyttede andre reaktive grupper,

5

c) kondensation af en aminosyre eller et peptid, der har en fri carboxylgruppe og beskyttede andre reaktive grupper, med en aminosyre eller et peptid, der har en aktiveret aminogruppe og eventuelt beskyttede andre reaktive grupper.

10

Aktivering af carboxylgruppen kan bl. a. udføres ved at omdanne carboxylgruppen til et syrehalogenid, et azid, et anhydrid, et imidazolid eller en aktiveret ester, såsom N-hydroxy-succinimid-, N-hydroxy-benzotriazol- eller p-nitrophenylestere.

15

Aminogruppen kan aktiveres ved at omdanne den til et phosphoramid eller ved at anvende "phosphorazo"-metoden.

20

De mest almindelige metoder til de ovenstående kondensationsreaktioner er: carbodiimid-metoden, azid-metoden, den blandede anhydrid-metode og den aktiverede ester-metode, som beskrevet i "The Peptides", bind I, 1965 (Academic Press) E. Schröder og K.Lübke.

25

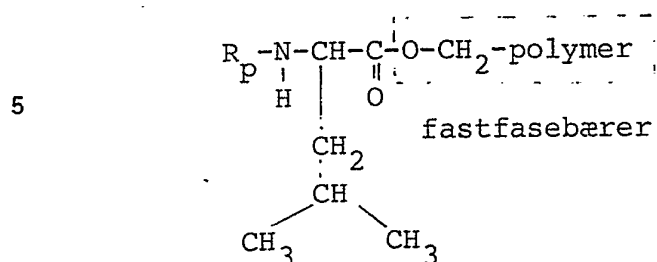
Forbindelserne ifølge formel I kan også fremstilles ved "fast-fase"-metoden (Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 85, 2149 (1963)). Koblingen af aminosyrerne i det peptid, der skal fremstilles, starter fra den side, der har carboxylendegruppen. Til denne reaktion er en fast bærer, hvorpå reaktive grupper er til stede eller hvorpå hvilken sådanne grupper kan fæstnes, nødvendig. Denne bærer kan f.eks. være en copolymer af benzen og divinylbenzen, der har reaktive chlormethylgrupper, eller en polymer bærer, der er blevet gjort reaktiv med hydroxymethyl eller benzylamin.

30

35

Hvis der f.eks. anvendes en bærer indeholdende chlormethylgrupper, finder binding af den første α -aminobeskyttede aminosyre til bæreren sted via en esterbinding. Ved syntesen af et

peptid ifølge formel I, hvori A betegner L-Leu, giver dette så f.eks. i første omgang:



10 hvori R_p er en α -aminobeskyttelsesgruppe.

Efter fjernelse af gruppen R_p kan den næste α -aminobeskyttede aminosyre (i dette tilfælde prolin, hvori α -aminogruppen er beskyttet) f.eks. kobles på ved hjælp af en kondensationsreaktion, og efter fjernelse af beskyttelsesgruppen fra α -aminogruppen, kan den næste aminosyre kobles på etc. I mange tilfælde er det ønskeligt at anvende et signifikant overskud af hver α -aminobeskyttet aminosyre.

20 Efter syntese af den ønskede aminosyresækvens frigøres peptidet fra bæreren ved hjælp af f.eks. HF eller trifluormethansulfonsyre. Peptidet kan også fjernes fra bæreren ved transforstring med en lavere alkohol, fortrinsvis methanol eller ethanol, hvorved en lavere alkylester af peptidet dannes direkte. Tilsvarende giver frigørelse med f.eks. ammoniak det C-terminale amidderivat af peptiderne I.

30 De reaktive grupper, som ikke skal deltage i kondensationsreaktionen, beskyttes ved hjælp af grupper, der nemt kan fjernes igen, f.eks. ved hydrolyse eller reduktion. En carboxylgruppe kan således beskyttes effektivt ved f.eks. forestring med methanol, ethanol, tetiær butanol, benzylalkohol eller p-nitrobenzylalkohol.

35 Grupper, der effektivt kan beskytte en aminogruppe, er sædvanligvis syregrupper, f.eks. en syregruppe hidrørende fra en alifatisk, aromatisk eller heterocyklisk carboxylsyre, såsom acetyl, benzoyl eller pyridincarboxylgruppen, eller en syregruppe hidrørende fra carbonsyre, såsom ethoxycarbonyl-, benzyloxy-

carbonyl-, tert-butoxycarbonyl- eller p-methoxybenzyloxycarbonylgruppen, eller en syregruppe hidrørende fra en sulfonsyre, såsom p-toluensulfonylgruppen, men andre grupper kan også anvendes, såsom substituerede eller usubstituerede aryl- eller aralkylgrupper, f.eks. benzyl og triphenylmethyl, eller grupper såsom ortho-nitrophenylsulphenyl eller 2-benzoyl-1-methylvinyl.

Det tilrådes, at ϵ -aminogruppen i lysin og guanidingruppen i arginin også beskyttes. Sædvanlige beskyttelsesgrupper i denne sammenhæng er en tertiær butoxycarbonylgruppe eller en tosyl (Tos)-gruppe for lysin og en nitrogruppe, Mbs-gruppe, Tos-gruppe eller Pms-gruppe for arginin.

Selv om aminosyren cystin kan anvendes i de ovenfor omtalte aminosyrekondensationer, er det ikke desto mindre foretrukket i første tilfælde at anvende aminosyren cystein, hvori thiolgruppen (-SH) er beskyttet ved hjælp af en sædvanlig SH-beskyttelsesgruppe, såsom acetamidomethyl eller trityl. Efter at den fuldstændige, ønskede aminosyresekvens (med cysteinyl i stedet for cystinyl) er blevet syntetiseret, kobles thiolgruppen af det cysteinradikal, der er tilstede i peptidet, derpå - eventuelt efter separat fjernelse af thiolbeskyttelsesgruppen - på kendt måde til thiolgruppen af et andet cysteinmolekyle eller til thiolgruppen af et andet molekyle af det samme peptid.

Beskyttelsesgrupperne kan afspaltes i overensstemmelse med forskellige sædvanlige metoder, afhængig af naturen af den pågældende gruppe, f.eks. ved hjælp af trifluoreddikesyre eller methansulfonsyre.

Med funktionelle derivater af peptiderne ifølge den almene formel I menes:

1. især de farmaceutisk acceptable syreadditionssalte og metalsalte af de pågældende peptider
2. N-acylderivater, hidrørende fra en alifatisk carboxylsyre, der har 1-6 carbonatomer, og fortrinsvis eddikesyre,

3. amider eller monoalkyl- eller dialkylsubstituerede amider, hvori alkylgruppen har 1-6 C-atomer,

4. estere, hidrørende fra alifatiske alkoholer, der har 1-6 C-atomer.

Syreadditionssaltene kan opnås direkte ved at isolere peptidet fra det ønskede sure medium, eller det opnåede peptid kan efterfølgende omdannes til et syreadditionssalt ved omsætning af peptidet med en syre, såsom HCl, HBr, phosphorsyre, svovlsyre, eddikesyre, maleinsyre, vinsyre, citronsyre eller polyglutaminsyre.

Metalsaltene, nemlig alkalimetalsaltene, opnås ved at omsætte peptidet med den ønskede metalbase, såsom NaOH, Na_2CO_3 , NaHCO_3 etc. eller, ved "fastfase"-metoden, ved at frigøre peptidet fra den faste bærer med et alkalimetahydroxid.

N-acylderivater, hvormed især menes de N-terminale acylderivater, fremstilles fortrinsvis under anvendelse af en aminosyre, der allerede er forsynet med den ønskede acylgruppe. Denne acylgruppe virker derpå også som en beskyttelsesgruppe under peptidsyntesen. På denne måde fremstilles det ønskede acylderivat direkte. Det er imidlertid også muligt at indføre den ønskede acylgruppe efter peptidsyntesen ved at acylere peptidet på sædvanlig måde.

Den foretrukne N-acylgruppe er acetylgruppen.

Estere og amider af peptiderne ifølge formel I fremstilles fortrinsvis under anvendelse (ved peptidsyntesen ifølge den homogene kondensationsmetode) af en aminosyre, der allerede er forsynet med den ønskede ester- eller amidgruppe. De kan imidlertid også fremstilles ved efterfølgende af forestre det opnåede peptid, eller ved at omdanne det til et amid, hvor disse reaktioner udføres på sædvanlig måde. Ved "fastfase"-metoden, kan estere opnås ved transforestring af peptid-fastfasekombinationen, og amiderne kan opnås ved behandling med ammoniak.

Der anvendes fortrinsvis de lavere, alifatiske estere, hidrørende fra en alkanol, der har 1-6 C-atomer, såsom methyl-, ethyl-, propyl-, isopropyl-, butyl-, sec.-butyl-, pentyl- eller hexylesteren.

5

De amider, der fortrinsvis anvendes, er det usubstituerede amid, monomethylamidet, dimethylamidet, monoethylamidet eller diethylamidet.

10

Peptiderne ifølge opfindelsen har, som allerede nævnt ovenfor, en psykofarmakologisk virkning og udviser især en indflydelse på hukommelsesprocesser. Denne indflydelse er udtalt og er overraskende stærkere end den fra kendte neuropeptider, såsom oxytocin og vasopressin.

15

Peptider ifølge den foreliggende opfindelse, hvor A betegner L-Lys eller L-Arg, fremmer kraftigt konsolideringen og generhvervelsen af hukommelsen og kan sædvanligvis anvendes i tilfælde, hvor en stimulering af hukommelsesprocesser (eller den mentale ydeevne er ønsket, såsom ved behandling af depressioner, men især ved behandling af forstyrrelser i indlæringsprocesser og hukommelsesprocesser, såsom de, der f.eks. kan forekomme i alderdommen (senilitet).

20

25

Peptider ifølge opfindelsen, hvori A betegner L-Leu, hæmmer konsolideringen og generhvervelsen af hukommelsen. Disse peptider bør almindeligvis anvendes i tilfælde, hvor en hæmning af centralnervesystemet og især af indlærings- og hukommelsesprocesser er ønskelig. De kan sædvanligvis anvendes som f.eks. sedativer og mere specielt ved behandling af tvangsneuroser.

30

Peptider med formelen I, der foretrækkes, er de, hvor Asx betegner asparaginy1.

35

Det farmaceutiske præparat ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved, at det indeholder peptidet som aktiv bestanddel i blanding med en bærer, der er egnet til farmaceutisk administration.

5

Peptiderne ifølge opfindelsen kan administreres oralt, rektalt, parenteralt, sublingualt eller intranasalt. Parenteral og intranasal administration er særlig foretrukket, idet absorptionen af peptidet i disse tilfælde er størst. Til dette formål blandes peptiderne fortrinsvis med farmaceutisk acceptable hjælpestoffer, der gør peptiderne egnede til parenteral eller intranasal administration, hvilket resulterer i opløsninger, suspensioner (evt. via mikro-indkapsling), emulsioner og sprays.

10

15

Blandet med egnede hjælpestoffer eller fyldstoffer kan de omtalte peptider også anvendes i en form, der er egnet til oral administration, såsom piller, tabletter og coatede tabletter. De omtalte peptider kan også administreres i form af en stikpille.

20

Peptiderne eller peptidderivaterne ifølge opfindelsen anvendes fortrinsvis i en dosis fra 1 ng til 5 µg pr. kg legemsvægt pr. dag til parenteral eller intranasal administration. Den anbefalede dosis til human administration er mellem 1 og 100 µg pr. dag. Til oral og rektal administration er dosen sædvanligvis en faktor 10-100 gange højere.

25

Med hensyn til eksemplerne bør følgende bemærkes.

30

I. Hvor der ikke er angivet nogen optisk konfiguration, menes L-formen.

II. De følgende forkortelser anvendes for de anvendte beskyttelses- eller aktiveringsgrupper:

35

Scm =S-carbomethoxysulphenyl

tBu =tertiær butyl

Boc	=tertiær butoxycarbonyl
Mbs	=4-methoxybenzensulphonyl
Pms	=pentamethylbenzensulphonyl
Me	=methyl
Trt	=trityl

5

III. De følgende forkortelser anvendes for de anvendte opløsningsmidler eller reagenser:

EtOH	= ethanol
BuOH	= butanol
Py	= pyridin
HOAc	= eddikesyre
t.BuOH	= tert.-butanol
MeOH	= methanol
DMF	= dimethylformamid
THF	= tetrahydrofuran
DCC	= dicyclohexylcarbodiimid
DCU	= dicyclohexylurinstof
TFA	= trifluoreddikesyre
To	= toluen
HOBt	= N-hydroxybenzotriazol

10

15

20

IV. De følgende forkortelser anvendes for aminosyregrupperne:

Lys	= lysyl
Arg	= arginyl
Pro	= prolyl
Cys	= cysteinyl
Asx	= aspartyl eller asparaginyll
Asp	= aspartyl
Asn	= asparaginyll
Cyt	= cystinyl
Leu	= leucyl

25

30

35

Eksempel 1

1. Boc-Asn-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mbs)-OtBu.

3,00 g (3,56 mmol) H-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mbs)-OtBu og 0,83 g (3,56 mmol) Boc-Asn-OH blev opløst i 30 ml DMF og afkølet

til -20°C . Ved denne temperatur tilsattes 0,58 g (4,27 mmol) HOBt og 0,81 g (3,92 mmol) DCC, og blandingen blev omrørt i en time. Derefter omrørtes i yderligere en time ved 0°C og natten over ved stuetemperatur, hvorefter det dannede DCU
 5 blev frafiltreret. Filtratet blev inddampet og resten opløst i 100 ml af en 3:2 methylenchlorid/2-butanolblanding. Derpå blev opløsningen ekstraheret successivt med 3 x 30 ml 5% NaHCO_3 -, 3 x 30 ml 5% KHSO_4 - og 3 x 30 ml 30% NaCl-opløsninger. Det organiske lag blev tørret med Na_2SO_4 og peptidet blev ud-
 10 fældet ved tilsætning af ether.

Udbytte: 3,25 g. Rf er 0,22 i en 8:2 To:EtOH-blanding.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1,9^{\circ}$ (c = 1, DMF).

15 2. Boc-Asn-Cys(Scm)-Pro-Arg(Mbs)-OtBu.

3,00 g (2,84 mmol) Boc-Asn-Cys(Trt)-Pro-Arg(Mbs)-OtBu (1) blev opløst i en blanding af 10 ml methanol og 50 ml methylenchlorid. 0,4 ml Scm-chlorid blev tilsat under omrøring, og ef-
 20 ter 5 minutter blev stoffet udfældet med ether. Bundfældet blev frafiltreret og derpå vasket med ether og tørret.

Udbytte: 2,56 g, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -66,9^{\circ}$ (c = 1, DMF).

Rf = 0,17 i en 8:2 To:EtOH-blanding.

25 H-Cys-OH

3. Boc-Asn-Cys-Pro-Arg(Mbs)-OtBu.HCl.

2,40 g (1,47 mmol) af det i 2. opnåede peptid, i 200 ml ethanol, blev anbragt i en kolbe indeholdende 650 mg (3,71 mmol) H-Cys-
 30 OH.HCl.H₂O i 10 ml methanol under nitrogen og under omrøring. Blandingen blev derpå omrørt i yderligere 40 minutter. Opløsningen blev inddampet, og peptidet blev udfældet med ether. Det dannede bundfæld blev derpå frafiltreret og tørret. Udbytte: 2,48g. Peptidet blev derpå opløst i en 2:3-blanding af 2-butanol/methy-
 35 lenchlorid, og opløsningen blev ekstraheret med vand. Peptidet i det organiske lag blev udfældet, og bundfældet blev frafiltreret og tørret. Udbytte: 850 mg.

Rf er 0,52 i en 70:30:5 methylenchlorid:methanol:vand-blanding.

H-Cys-OH
|
4. H-Asn-Cys-Pro-Arg-OH.

850 mg (0,88 mmol) af det i 3. opnåede peptid blev opløst i en blanding af 15 ml TFA og 2,2 ml (35,2 mmol) MSA og 0,2 ml thioanisol, og opløsningen blev omrørt i 5 timer. Reaktionsblandingens blev hældt i ether, og det dannede bundfald blev frafiltreret og vasket med ether. Derefter blev bundfaldet opløst i en 1:1 tert.-butanol/vand-blanding, underkastet udbytning på en ionbytter i acetatform og frysetørret. Udbytte: 639 mg. Stoffet blev derpå oprenset ved hjælp af en silicagelkolonne, under anvendelse af butanol/eddikesyre/vand (2:1:1) som elueringsmidlet. Udbytte: 315 mg.
 $[\alpha]_D^{20} = -136,3^{\circ}$, (c = 0,25, 10% HOAc).

15

Eksempel 21. Boc-Asn-Cys(Trt)-Pro-Leu-OtBu.

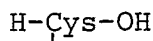
2,50 g (2,86 mmol) Trt-Cys(Trt)-Pro-Leu-OtBu blev opløst i 25 ml eddikesyre, hvorpå der blev tilsat 2,5 ml vand. Blandingen blev derpå omrørt i en time, hvorefter der blev tilsat 10 ml vand, og det dannede bundfald blev frafiltreret. Den opløsning, der blev tilbage, blev derefter inddampet og resten opløst i ethylacetat, hvorpå opløsningen blev vasket med 3 x 50 ml 5% NaHCO₃- og 3 gange med en mættet NaCl-opløsning. Det organiske lag blev tørret og derpå inddampet. Resten blev opløst i 25 ml DMF, hvorpå der blev tilsat 655 mg (2,86 mmol) Boc-Asn-OH. Blandingen blev afkølet til -15°C, hvorpå der blev tilsat 464 mg (3,43 mmol) HOBt og 651 mg (3,15 mmol) DCC i rækkefølge. Efter at blandingen var blevet omrørt i nogen tid, blev den afkølet yderligere til -25°C, hvorefter DCU blev frafiltreret og opløsningen inddampet. Resten blev opløst i 50 ml ethylacetat og vasket med 3 x 25 ml 5% NaHCO₃-opløsning, 3 x 25 ml 5% KHSO₄-opløsning og 3 x 25 ml mættet NaCl-opløsning. Det organiske lag blev derpå tørret over Na₂SO₄ og inddampet. Efter at resten var blevet opløst i ether, udkrystalliserede peptidet. Disse krystaller blev derpå frafiltreret og tørret.

Udbytte: 1,64 g. Smeltepunkt 127-128°C,
 $[\alpha]_D^{20} = -18,1^\circ$ (c = 1, DMF).

2. Boc-Asn-Cys(Scm)-Pro-Leu-OtBu.

5

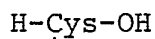
1,50 g (1,78 mmol) af det i 1. opnåede peptid blev opløst i
 10 ml methylenchlorid, hvorpå der blev tilsat 0,3 mmol Scm-
 chlorid. Efter at blandingen var blevet omrørt i 5 minutter,
 blev det dannede bundfald frafiltreret, vasket med ether og
 10 tørret. Udbytte 0,95 g. $[\alpha]_D^{20} = 103,8^\circ$ (c = 1, DMF), smelte-
 punkt 123°C (dekomponering).



3. Boc-Asn-Cys-Pro-Leu-OtBu.HCl.

15

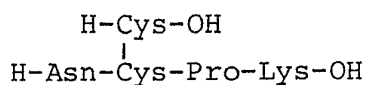
500 mg (0,71 mmol) af det i 2. opnåede peptid blev opløst i
 10 ml trifluorethanol, hvorpå 249 mg (1,42 mmol) cystein.
 $\text{H}_2\text{O.HCl}$ i 1 ml methanol blev tilsat til denne opløsning. Efter
 omrøring i 4 timer blev opløsningen inddampet, og resten blev
 20 omrørt med ether.
 Udbytte : 600 mg.



4. H-Asn-Cys-Pro-Leu-OH.

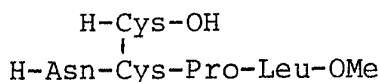
25

600 mg (0,71 mmol) af det i 3. opnåede peptid blev opløst i
 10 ml TFA med en styrke på 90%, og opløsningen blev omrørt i
 45 minutter ved stuetemperatur. Blandingen blev hældt ud i
 ether, og det dannede bundfald blev frafiltreret, vasket med
 30 ether og tørret. Dette bundfald blev opløst i vand og blev un-
 derkastet udbytning på en ionbytter i acetatform og derpå fry-
 setørret. Dette frysetørrede materiale blev oprenset ved mod-
 strømsfordeling (system: BuOH/HOAc/vand (4:1:5)). Det således
 opnåede stof blev yderligere rensat på en silicagelkolonne.
 35 Udbytte: 200 mg.
 $R_f = 0,18$ i BuOH/Py/HOAc/vand (8:3:1:4).

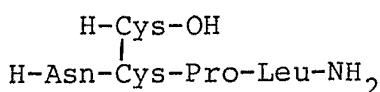
Eksempel 3

5

blev fremstillet på en måde, svarende til eksempel 1, og



10



blev fremstillet på en måde, svarende til eksempel 2.

15

Eksempel 41. (Boc-Asn-Cys-Pro-Leu-OtBu)₂.

20

500 mg (0,58 mmol) Boc-Asn-Cys-(Trt)-Pro-Leu-OtBu (eksempel 2.1) blev opløst i 127 ml af en 0,005 molær opløsning af jod, og blandingen blev omrørt i en time. Derpå blev der tilsat tilstrækkeligt 1 N natriumthiosulfat til at forårsage, at den brunrøde farve forsvandt. Efter tilsætning af 0,7 ml 1 N NaOH og 150 ml vand dannedes et bundfald, og dette blev frafiltre-

25

ret. Resten blev opløst i methylenchlorid, hvorpå den blev udfældet igen med ether/hexan (1:1), frafiltreret og tørret.

Udbytte: 310 mg.

R_f = 0,70 i methylenchlorid:MeOH:vand (70:30:5) på SiO₂.

30

2. (H-Asn-Cys-Pro-Leu-OH)₂.

300 mg (0,24 mmol) af det i 1. opnåede peptid blev opløst i 10 ml 90% TFA-opløsning, og opløsningen blev omrørt i en time. Den blev hældt ud i ether, og det dannede bundfald blev frafiltreret.

35

Dette bundfald blev genopløst i vand, hvorpå opløsningen blev behandlet med en ionbytter i acetatform. Derpå blev opløsningen yderligere rensset over en silcagelkolonne, under anvendelse af BuOH:Py:HOAc:vand (8:3:1:4) som elueringsmidlet.

5 Udbytte: 105 mg.

Rf i det ovennævnte opløsningsmiddel (elueringsmidlet) = 0,18 på SiO₂.

10

Eksempel 5

Det i eksempel 1.1. opnåede peptid blev behandlet med jod på

den i eksempel 4.1 beskrevne måde, hvorpå peptidet (H-Asn-Cys-Pro-Arg-OH)₂ blev opnået på samme måde som beskrevet i eksempel 1.4.

Rf i BuOH:HOAc:vand (1:2:1) = 0,20 på SiO₂.

Følgende blev fremstillet på tilsvarende måde:

20

(H-Asn-Cys-Pro-Lys-OH)₂,

(H-Asn-Cys-Pro-Leu-OMe)₂

og

25

(H-Asn-Cys-Pro-Leu-NH₂)₂.

Eksempel 6

30

Til belysning af virkningen af peptiderne ifølge opfindelsen udførtes følgende adfærdsforsøg.

35

AdfærdsforsøgPassiv afværgedfærd.

- 5 Hanrotter af en indavlet stamme (CPB-TN0, Zeist, Holland) med en vægt på 140-160 g blev holdt under standardbetingelser (stuetemperatur, $22 \pm 1^\circ\text{C}$, lys tændt fra kl. 5.00 til kl. 19.00) og huset i grupper på fem med vand og føde ad libitum. Forsøgene udførtes i lyddæmpede rum mellem kl. 9.00 og 17.00.
- 10 Dyrene blev trænet i et passivt afværgeforsøg med et-forsøgsindlæring og af typen "step-through". Forsøgsapparatet bestod af en oplyst platform forbundet til et stort, mørkt rum, der var udstyret med et gittergulv. Efter tilvænnning til det mørke rum (2 min.), placeredes rotterne på platformen og fik lov til
- 15 at gå ind i det mørke rum. Fordi rotter foretrækker mørke frem for lys, går de normalt ind i løbet af 15 sek. Næste dag efter yderligere tre forsøg leveredes et uundgåeligt fodchok (0,25 mA, 2 sek.) gennem gittergulvet i det mørke rum (betingningsforsøg). Rotterne blev fjernet fra chokkassen 10 sek. efter afslutning af fodchokket. Passiv afværgelatenstid blev målt 24 og 48 timer efter betingningsforsøget (retentionsforsøg), idet rotten blev placeret på platformen, hvorefter latenstiden for indtræden i det mørke rum målt i en periode på maksimalt 300
- 20 sek. For at vurdere peptidernes indflydelse på konsolideringsprocesser injiceredes peptiderne umiddelbart efter indlæringsforsøget ("postindlæringsbehandling"), medens deres indflydelse på generhvervelsesprocesser bestemtes ved injektion 1 time før den første retentionsrække (præretentionsbehandling). For
- 25 at vise OXT-fragmenters svækkende virkning var chokintensiteten i forsøg med disse peptider 0,50 mA for at inducere længere afværgelatenstider under retention.
- 30

Resultaterne af forsøget er vist i nedenstående tabeller.

Tabel 1

Virkning af forskellige AVP-fragmenter, injiceret subkutant i forskellige doser, på afværgedfærd

5

	Behandling	Dosis ^b	Efter indlæring passiv	Præretention passiv
	Afværged- adfærd ^a			
		µg		
10	AVP-(1-9)	Placebo	86 ^c	78 ^c
		0,1	110	-d
		0,3	177*	103
		1	221**	136*
		3	300**	176**
15		10	- d	282**
	AVP-(1-8)	Placebo	76	77
		0,1	107	103
		0,3	146*	142*
		1	192**	240**
20		3	232**	300**
	AVP-(3-9)	Placebo	77	81
		0,3	80	-d
		1	131*	116
		3	220**	180*
25		10	- d	232**
	AVP-(4-9)	Placebo	79	88
		0,01	124	-d
		0,03	179*	103
		0,1	240**	142*
30		0,3	300**	264**
		1	- d	300**
	AVP-(4-8)	Placebo	80	80
		0,01	120	-d
		0,03	141*	103
35		0,1	251**	155*
		0,3	300**	182**
		1	- d	274**

5	AVP-(4-7)	Placebo	74	73
		0,3	73	-d
		1	130	60
		3	156*	81
		10	171*	109
10	AVP-(5-9)	Placebo	81	77
		0,01	- d	93
		0,03	102	150*
		0,1	146*	243**
		0,3	180**	300**
		1	263**	-d
15	AVP-(5-8)	Placebo	83	73
		0,003	110	-d
		0,01	148*	-d
		0,03	230**	91
		0,1	300**	132*
		0,3	300**	171*
		1	- d	238**
20	AVP-(6-8)	3	- d	300**
		Placebo	72	81
		3	83	78
		10	112	117

25 a Peptider eller placebo administreredes subkukant umiddelbart efter betingningsforsøget (passiv afværgedfærd, chok: 0,25 mA, 2 sek.) eller 1 time før det første retentionsforsøg for passiv afværgedfærd (præretention). Grupper på 5 til 11 rotter injiceredes med peptid, og grupper på 12 til 21 rotter med placebo.

b Mængde injiceret per dyr.

30 c Middelfaværgelatenstid (sek.) for det første retentionsforsøg (24 timer).

d - ikke bestemt.

* Forskellig fra placebobehandlede kontroller (*P<0,05; **P<0,02).

35

Som det fremgår af tabel 1, var det mest potente fragment til at lette passiv afværgedfærd efter behandling efter indlæring

AVP-(5-8), der var signifikant mere potent end AVP-(1-9), AVP-(1-8), AVP-(3-9) og AVP-(5-9). Peptidet AVP-(5-8) var også det korteste aktive fragment, idet AVP-(4-7) og AVP-(6-8) viste sig at være inaktive.

5

Tabel 2

Virkning af forskellige OXT-fragmenter, injiceret subkutant i forskellige doser, på retention af passiv afværgedfærd.

10

	Behandling ^a	Dosis ^b	Efter indlæring	Præretention
		µg		
15	OXT-(1-9)	Placebo	171 ^c	185 ^c
		0,3	110	120
		1	46*	53*
		3	63*	71*
20	OXT-(1-8)	Placebo	171	185
		0,3	120	112
		1	51*	62*
		3	83*	85*
25	OXT-(3-9)	Placebo	159	172
		1	106	123
		3	46*	65*
	OXT-(4-9)	Placebo	163	165
0,1		109	116	
0,3		50*	51*	
30	OXT-(4-8)	Placebo	163	182
		0,1	119	93
		0,3	57*	54*
	OXT-(5-9)	Placebo	156	165
0,03		-d	91	
0,1		-d	58*	
0,3		157	34*	
1		110	-d	
35	OXT-(5-8)	3	72*	-d
		Placebo	172	167
		0,1	101	-d

0,3

47*

118

1

-d

55*

a Behandlingen blev udført subkutant umiddelbart efter betingningsforsøget eller 1 time før det første retentionsforsøg for passiv afværgedfærd (chok: 0,5 mA, 2 sek.). Grupper på 5 til 6 rotter blev behandlet med peptid, og grupper på 5 til 11 rotter med placebo.

b Mængde injiceret per dyr.

c Middel afværgelatenstid (sek.) for det første retentionsforsøg (24 timer).

d - ikke bestemt.

* Forskellig fra placebobehandlet kontrol (*P<0,05).

Som det fremgår af ovenstående tabel, svækkede forskellige fragmenter af dette hormon passiv afværgedfærd, dvs. hæmmer hukommelsesprocessen, efter subkutan indgift umiddelbart efter betingningsforsøget. Det fremgår, at OXT-(5-8)-peptidet ifølge opfindelsen er et af de mest potente fragmenter.

P a t e n t k r a v .

1. Peptid, k e n d e t e g n e t ved den almene formel:

25

R

|

X-L-Asx-L-Cys-L-Pro-L-A-Y

I

hvor A betegner Arg, Lys eller Leu, og R betegner gruppen

30

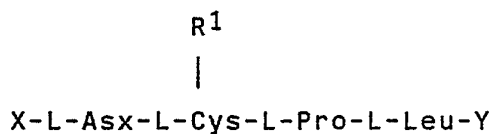
|

|

X-L-Cys-Y eller X-L-Asx-L-Cys-L-Pro-L-A-Y, hvor X er H eller acyl, hidrørende fra en alifatisk carboxylsyre, der har 1-6 C-atomer, og Y er OH, NH₂, NHR', NR'₂ eller OR', hvor hver R' er alkyl med 1-6 C-atomer, og deres farmaceutisk acceptable syre-additionssalte og metalsalte.

35

2. Peptid ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved formlen:



5

hvor R^1 betegner H-L-Cys-OH eller gruppen H-L-Asx-L-Cys-L-Pro-L-Leu-OH, og X og Y har de i krav 1 definerede betydninger.

10 3. Peptid ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved formlen:



15

hvor R^2 betegner gruppen H-L-Cys-OH eller gruppen H-L-Asx-L-Cys-L-Pro-L-Arg(eller L-Lys)-OH, og X og Y har de i krav 1 definerede betydninger.

20

4. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder peptidet ifølge krav 1 som aktiv bestanddel i blanding med en bærer, der er egnet til farmaceutisk administration.

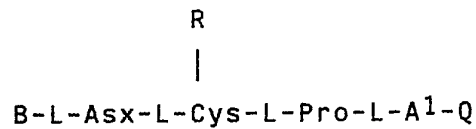
25

5. Fremgangsmåde til fremstilling af et peptid ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man kobler de krævede (om nødvendigt beskyttede) aminosyrer ved hjælp af kondensation enten i den homogene fase eller på en såkaldt fast fase, fjerner de eventuelle beskyttelsesgrupper og om ønsket omdanner det opnåede peptid til et andet derivat med formel I som defineret i krav 1.

30

35

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at beskyttelsesgruppen (-grupperne) og/eller den fastfasebærer, der er til stede i et peptid med den almene formel:



- 5 hvori R har den ovenfor angivne betydning,
 B betegner hydrogen, en N-acyl (1-6 C)-del eller en N-beskyttelsesgruppe,
 Q betegner hydroxy, acyloxy (1-6 C), en eventuelt mono- eller
 dialkyl(1-6C)substitueret amidgruppe, en O-beskyttelsesgruppe
 10 eller en fastfasebærer og
 A¹ har de samme betydninger som A, men desuden kan betegne en
 ε-beskyttet lysylgruppe eller guanidinbeskyttet arginylgruppe,
 med den forudsætning, at såfremt Q ikke betegner en fastfase-
 bærer, må der mindst være én beskyttelsesgruppe til stede (en-
 15 ten i B, Q eller A¹),

fjernes, hvorpå det opnåede peptid om ønsket omdannes til et
 andet derivat deraf med formel I som defineret i krav 1.

20

25

30

35