

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 148305 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 5103/74

(51) Int.Cl.⁴: C 07 K 7/20

(22) Indleveringsdag: 27 sep 1974

(41) Alm. tilgængelig: 30 mar 1975

(44) Fremlagt: 03 jun 1985

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 29 sep 1973 JP 109951/73 28 mar 1974 JP 27442/74

(71) Ansøger: *TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD.; Osaka, JP.

(72) Opfinder: Masahiko *Fujino; JP, Tsunehiko *Fukuda; JP, Susumu *Shinagawa; JP.

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af et
LH-RH-analogt nonapeptidamidderivat eller et
salt eller metalkompleks deraf

Rettelse til fremlæggesesskrift nr. 148305

(Offentliggjort den 3. juni 1985)

Int Cl.⁴ C 07 K 7/20

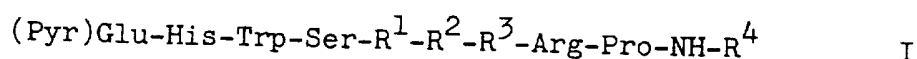
Læs prioritetsbegæringen således:

29 sep 1973 JP 109951/73
08 mar 1974 JP 27442/74

DIREKTORATET FOR PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET I KØBENHAVN

UK 148305 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt LH-RH-analogt nonapeptidamidderivat med kraftig ovulationsfremkaldende virkning, og med den almene formel



hvor R^1 er Tyr eller Phe, R^2 er D-Leu, D-Ile, D-Nle, D-Val, D-Nva, D-Abu, α -Aibu, D-Phe, D-Phg, D-Ser, D-Thr eller D-Met, R^3 er Leu, Ile eller Nle og R^4 er en alkylgruppe med 1-3 kulstofatomer som kan være substitueret med en hydroxylgruppe, eller et salt eller metalkompleks deraf.

I nærværende beskrivelse og krav er aminosyrer og peptider betegnet med forkortelser som er almindeligt anvendte inden for det særlige fagområde eller som er vedtaget af Committee on Biochemical Nomenclature of IUPAC-IUB. Aminosyrer er i L-konfiguration med mindre andet er angivet.

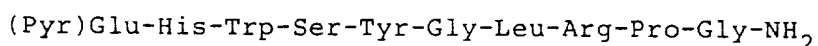
Der anvendes således følgende forkortelser:

Abu:	α -Aminosmørsyre
α -Aibu:	α -Aminoisosmørsyre
Arg:	Arginin
BOC:	t-Butoxykarbonyl
Bzl:	Benzyl
DCC:	N,N'-Dicyklohexylkarbodiimid
Gly:	Glycin
His:	Histidin
HONB:	N-Hydroxy-5-norbonen-2,3-dikarboximid
HOSu:	N-Hydroxysuccinimid
IBOC:	Isobornyloxykarbonyl
Ile:	Isoleucin
Leu:	Leucin
Nle:	Norleucin
Nva:	Norvalin
Met:	Metionin
OMe:	Metylester
OBzl:	Benzylester
ONB:	N-hydroxy-5-norbonen-2,3-dikarboximidester
OSu:	N-hydroxysuccinimidester

Phe:	Fenylalanin
Phg:	α -fenylglycin
Pro:	Prolin
(Pyr)Glu:	Pyroglutaminsyre
Ser:	Serin
Thr:	Treonin
Tos:	Tosyl
Trp:	Tryptofan
Tyr:	Tyrosin
Val:	Valin
Z:	Benzyloxykarbonyl

Den ovenfor nævnte substituent R^4 der er en lige-kædet eller forgrenet alkylgruppe med 1-3 kulstofatomer som kan være substitueret med en hydroxylgruppe kan fx være metyl, ætyl, n-propyl, isopropyl, hydroxymetyl, 1-hydroxyætyl, 2-hydroxyætyl, 2-hydroxy-n-propyl eller 3-hydroxy-n-propyl.

Det har været kendt i mange år at hypotalamus indeholder faktorer som på et højere niveau kontrollerer sekretionen af tropiske hormoner fra hypofysen. For nylig er der efter isoleringen af et tyrotropi-stimulerende hormon (TRH) ekstraheret et hormon (LH-RH) som fremmer sekretionen af luteiniserende hormon i ren form fra svin og får, og det har vist sig at være et decapeptid med strukturen:



(A.V. Schally et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 1334, 1971; R. Guillemin et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 69 278, 1972). Denne opdagelse er blevet fulgt af syntesen af et tilsvarende antal peptider og der har også været udført biologiske prøver på disse analoge peptider. Imidlertid formindsker selv en lille modifikation i den ovenfor viste aminosyresammensætning i alvorlig grad den fysiologiske virkning af peptidet og den ovenfor viste kemiske struktur har været anset som essentiel til frembringelse af maksimal fysiologisk virkning. (A.V. Schally et al, Biochem, Biophys. Res. Commun., 4, 366, 1972).

Fra Biochem. Biophys. Res. Commun., Bind 49, nr. 3, side 863-869 (1972) kendes LH-RH-analoge nonapeptidamidderivater med en ovulationsfremkaldende virkning på op til 5 gange virkningen af LH-RH.

Det har på denne baggrund imidlertid vist sig at nonapeptidamidderivaterne med formel I har en overraskende kraftigere ovulationsfremkaldende virkning både i sammenligning med det naturligt forekommende decapeptid LH-RH og i sammenligning med de ovennævnte kendte nonapeptidamidderivater.

Det har også vist sig at disse forbindelser virker på hypofysen ved at fremme sekretionen af såvel luteiniserende hormon og follikelstimulerende hormon. Det har desuden vist sig at disse forbindelser ikke blot er nyttige som lægemidler til mennesker, fx midler til behandling af amenoré, men også som veterinært lægemiddel. Den foreliggende opfindelse bygger på disse uventede opdagelser.

Det er således formålet med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe en analogifremgangsmåde til fremstilling af nonapeptidamidderivaterne med den almene formel I.

Dette opnås ved en fremgangsmåde, der er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del angivne.

Nonapeptidamidderivatet med formel I fremstilles således ved at et reagens A - L-pyroglutaminsyre eller et peptidfragment som har en L-pyroglutaminsyreenhed (dvs. (Pyr)Glu) i dets N-terminale ende og som indeholder 1-9 aminosyrer af den ovenfor viste aminosyresekvens, regnet fra den N-terminale ende - kondenseres med et reagens B - en aminoforbindelse som svarer til den resterende del af nonapeptidamidderivatet med formel I -, hvilke to reagenser A og B eventuelt er beskyttet med én eller flere beskyttelsesgrupper, hvorefter eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgrupper fjernes.

Således er reagens A L-pyroglutaminsyre eller et peptidfragment som har en L-pyroglutaminsyreenhed i sin N-terminale ende og som indeholder 1-9 aminosyrer af aminosyresekvensen med formel I, regnet fra den N-terminale ende, og reagenset B som kondenseres med reagenset A er en aminoforbindelse som svarer til den resterende del af nonapeptidamidderivatet I, reagenserne A og B er eventuelt beskyttede.

De grundliggende kombinationer af reagens A og reagens B er eksemplificeret i følgende tabel I.

Tabel 1.

Reagens Kombination	(A)	(B)
1	(Pyr)Glu-OH	H-His-Trp-Ser-R ¹ -R ² - R ³ -Arg-Pro-NH-R ⁴
2	(Pyr)Glu-His-OH	H-Trp-Ser-R ¹ -R ² -R ³ - Arg-Pro-NH-R ⁴
3	(Pyr)Glu-His- Trp-OH	H-Ser-R ¹ -R ² -R ³ -Arg-Pro- NH-R ⁴
4	(Pyr)Glu-His- Trp-Ser-OH	H-R ¹ -R ² -R ³ -Arg-Pro- NH-R ⁴
5	(Pyr)Glu-His- Trp-Ser-R ¹ -OH	H-R ² -R ³ -Arg-Pro- NH-R ⁴
6	(Pyr)Glu-His- Trp-Ser-R ¹ -R ² - OH	H-R ³ -Arg-Pro-NH-R ⁴
7	(Pyr)Glu-His- Trp-Ser-R ¹ -R ² - R ³ -OH	H-Arg-Pro-NH-R ⁴
8	(Pyr)Glu-His- Trp-Ser-R ¹ -R ² - R ³ -Arg-OH	H-Pro-NH-R ⁴
9	(Pyr)Glu-His- Trp-Ser-R ¹ -R ² - R ³ -Arg-Pro-OH	NH ₂ -R ⁴

Kondensationsreaktionen ifølge den foreliggende opfindelse kan gennemføres ved kendte kondenseringsmetoder for dannelse af peptidbindinger. Blandt sådanne kondensationsmetoder er DCC/HONB-processen (belgisk patentskrift nr. 796.399), azidprocessen, kloridprocessen, syreanhydridprocessen, blandet syreanhydridprocessen, DCC-processen, aktiv ester processen, Woodward reagens K processen, karbodiimidazolprocessen, oxydationsreduktionsprocessen og andre metoder (The Peptides, Vol. 1, 1966, Schröder og Lubke, Academic Press, New York, USA).

Før kondensationsreaktionen kan man beskytte de karboxyl- og aminogrupeer der ikke skal involveres i den påtænkte reaktion eller man kan aktivere de karboxyl- og/eller aminogrupeer der skal tage del i reaktionen på i og for sig kendt måde. Karboxylgrupperne i udgangsmaterialet kan beskyttes i form af metalsaltet (fx natrium- og kaliumsaltet) eller estere (fx metyl-, ætyl-, benzyl-, p-nitrobenzyl-, t-butyl- eller t-amylestere).

Beskyttelsesgrupper for aminogrupeer i udgangsmaterialerne kan være en hvilken som helst konventionel beskyttelsesgruppe for aminogrupeer ved peptidsyntese, fx benzyloxykarbonyl, t-butyloxykarbonyl eller isobornyloxykarbonyl. Hydroxylgruppen i serin kan beskyttes med en konventionel beskyttelsesgruppe såsom benzyl, t-butyl eller andre æterdannende grupper. Hydroxylgruppen i tyrosin kan beskyttes med benzyl, t-butyl eller andre æterdannende grupper. Guanidingruppen i arginin kan beskyttes med sådanne grupper som nitro, tosyl, karbobenzoxo, isobornyloxykarbonyl eller adamantykoxykarbonyl. Som eksempler på aktiverede karboxylgrupper i udgangsmaterialerne kan nævnes det tilsvarende syreanhydrid, azid, aktive estere (estere med alkoholer, fx pentaklorfenol, 2,4,5-triklorfenol, 2,4-dinitrofenol, cyanometylalkohol, p-nitrofenol, N-hydroxy-5-norbonen-2,3-dikarboximid, N-hydroxysuccinimid, N-hydroxyftalimid eller N-hydroxybenzotriazol). De aktiverede aminogrupeer i udgangsmaterialerne kan fx være tilsvarende fosforsyreamider.

Følgende tabel viser nogle eksempler på kombinationer af sådanne former af karboxyl- og aminogrupeer i materialerne A og B.

Tabel 2

Kombinationseksampler	Reagenser			
	(A)		(B)	
1 ^x	COOH	NH ₂	COOH	NH ₂
	fri	beskyttet	beskyttet	fri
2	aktiveret	beskyttet	fri	fri
3	fri	beskyttet	beskyttet	aktiveret

NB: I tilfældet betegnet med x, er der fortrinsvis et dehydreringsmiddel til stede i reaktionssystemet (fx et karbodiimidreagens såsom dicyklohexylkarbodiimid. En praktisk udførelsesform for denne opfindelse kan skrives på følgende måde

(Pyr)Glu-His-Trp + Ser-R¹-beskyttelsesgruppe

kondensation (fx DCC/HONB)

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R¹-beskyttelsesgruppe

fjernelse af en beskyttelsesgruppe (fx katalytisk reduktion med Pd-katalysator)

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R¹

NO₂
|
Z-R²-R³-Arg-Pro-NH-R⁴
fjernelse af en beskyttelsesgruppe (fx i nærværelse af HBr)

NO₂
|
R²-R³-Arg-Pro-NH-R⁴

Kondensation (fx i nærværelse af DCC/HONB eller DCC/1-hydroxybenzotriazol)

NO₂
|
(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R¹-R²-R³-Arg-Pro-NH-R⁴

Fjernelse af beskyttelsesgruppe (fx i nærværelse af SnCl₂ i myresyre/vand, katalytisk reduktion med Pd-katalysator, eller HF)

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-R¹-R²-R³-Arg-Pro-NH-R⁴

Denne reaktion kan gennemføres i nærværelse af et opløsningsmiddel. Opløsningsmidlet kan vælges blandt dem der er kendt som nyttige til peptidkondensationsreaktioner. Således kan der som eksempel nævnes vandfrit eller vandigt dimetylformamid, dimetylsulfoxyd, pyridin, kloroform, dioxan, diklormetan, tetrahydrofuran og passende blandinger af sådanne opløsningsmidler.

Reaktionstemperaturen vælges inden for det område der er kendt som anvendeligt for reaktioner der fører til dannelse af peptidbindinger, dvs. normalt inden for området ca. -20 og ca. 30°C. Desuden kan prekursormaterialerne (beskyttede peptider) af de ønskede forbindelser ifølge opfindelsen let fremstilles ved fastfasesynteser.

Efter den ønskede kondensationsreaktion er tilendebragt kan beskyttelsesgrupper, dersom produktet bærer sådanne, fjernes ved kendte metoder. Blandt sådanne kendte metoder er katalytisk reduktion i nærværelse af en katalysator såsom palladiumsort, palladium-på-kulstof, platin eller lignende, solvolyse ved hjælp af hydrogenfluorid, trifluoreddikesyre eller lignende, og reduktion med metallisk natrium i flydende ammoniak.

Det således fremstillede peptid med formel I kan udvindes fra reaktionsblandingen ved kendte metoder til udvinning af peptider, fx ved ekstraktion, fordelingskromatografi eller søjlekromatografi.

Peptidet med formel I kan også udvindes i form af et salt eller en metalkompleksforbindelse.

Som syre der er i stand til at danne salte med peptider med formel I kan nævnes uorganiske syrer såsom saltsyre, brombrintesyre, perklorisyre, salpetersyre, tiocyansyre, svovlsyre og fosforsyre, og organiske syrer såsom myresyre, eddikesyre, propionsyre, glykolsyre, mælkesyre, pyrodruesyre, oxalsyre, malonsyre, ravsyre, æblesyre, fumarsyre, antranylsyre, kanelsyre, naftalensulfonsyre eller sulfanylsyre.

De metaller der er i stand til at danne metalkompleksforbindelser med peptidet med formel I indbefatter bl.a. zink, nikkel, kobolt, kobber og jern. Sådanne metalkompleksforbindelser kan fremstilles ved konventionelle metoder, fx ved at omsætte peptidet med formel I med hydroxydet eller oxydet af et metal af den ovennævnte art ved en pH-værdi på ca. 6-8.

De ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser med

formel I har en LH-RH-(luteiniserende hormon-stimulerende hormon)-virkning og de er således i stand til at fremme sekretionen af LH(luteiniserende hormon) og FSH(follikelstimulerende hormon). Polypeptider med formel I er således nyttige som lægemidler til fremkaldelse af ovulationer hos kvinder og hundyr (fx rotter, får, svin, køer, hopper vagtler eller høns). Peptiderne kan også anvendes til andre farmaceutiske formål hvortil der har været anvendt konventionelle præparater af LH-RH, LH og FSH.

Eftersom LH-RH-virkningen af polypeptiderne med formel I er ca. 5 til 80 gange så stor som for naturligt forekommende LH-RH kan den anvendte dosis ved hver indgift bestemmes på grundlag af det nævnte forhold mens man også tager andre faktorer i betragtning (fx det under behandling værende individ og arten af sygdommen). Fx kan en passende dosis vælges inden for området ca. 2 ng til 2 µg per dag per kg legemsvægt.

Polypeptiderne med formel I indgives først og fremmest ad ikke-oral vej (fx ved injektion eller ad rektal eller vaginal vej) selv om de indgives oralt i visse tilfælde.

De anvendelige dosisformer indbefatter fx injektionsblandinger, suppositorier, pessarer og pulvere. Injektionsblandingerne kan fremstilles ved at man opløser ca. 10 mikrogram til 100 mikrogram af polypeptid I i 1 ml fysiologisk saltopløsning. Polypeptiderne med formel I kan også tilberedes i form af frysetørrede ampulprodukter med mannitol tilsat som excipiens således at man kan indgive dem i form af på stedet fremstillede injektionsblandinger.

De peptidudgangsmaterialer der kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan fremstilles enten på kendt måde for peptidsyntese eller ved at anvende sådanne metoder som måtte være nødvendige.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere i det følgende ved hjælp af nogle eksempler.

I disse eksempler betegner følgende forkortelser Rf-værdien ved tyndlagskromatografi på silikagel med følgende opløsningsmiddelsystem.

Rf¹: kloroform/metanol/eddikesyre, 9:1:0,5

Rf²: ætylacetat/pyridin/eddikesyre/vand, 30:10:3:5

Rf³: n-butanol/ætylacetat/eddikesyre/vand, 1:1:1:1.

I eksemplerne nævnes følgende varemærker hvoraf "Sephadex" og "Amberlite" er indregistreret i Danmark mens

"Biogel" ikke er indregistreret i Danmark.

"Biogel" P-2: materialer til gelfiltrering fremstillet af BIO-RAD, USA.

"Sephadex" LH-20: forestret dextrangel.

"Amberlite" XAD-2: polystyrenharpiks.

"Amberlite" IR-45: svagt basisk anionbytter.

"Amberlite" IRA-410: stærkt basisk anionbytter.

"Amberlite" CG-410: stærkt basisk anionbytter.

"Amberlite" CG-45: svagt basisk anionbytter.

Eksempel 1

 (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂CH₃

a) Z-D-Leu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 50 ml diklormetan opløses 1,58 g Z-D-Leu-OH (olie) og 1,2 g HONB efterfulgt af tilsætning af 2,8 g H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃. Blandingen afkøles til 0°C hvorefter der tilsættes 1,4 g DCC og blandingen omrøres ved stuetemperatur i 8 timer. Det som biprodukt fremstillede dicyklohexylurinstof fjernes ved filtrering og filtratet koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen opløses i 150 ml ætylacetat, vaskes 2 gange med en 4% vandig opløsning af natriumhydrogenkarbonat og 2 gange med vand, tørres over natriumsulfat og koncentrerer til sidst til tørhed under nedsat tryk. Remanensen genudfældes fra ætylacetat/petroleumsbenzin. Den beskrevne procedure giver 3,6 g af den ønskede forbindelse. Smp. 134°C (sønderdeling). $\alpha_D^{25} = -47,3^\circ$ (c = 0,54 i metanol), $R_f^1 = 0,57$.

Beregnet for C₃₃H₅₃O₈N₉:

	C 56,31,	H 7,59,	N 17,91
Fundet:	C 56,08,	H 7,82,	N 17,69%.

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 30 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 3,6 g Z-D-Leu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og opløsningen hvirvles rundt ved stuetemperatur i 50 minutter. Til opløsningen sættes 300 ml æter og det resulterende bundfald fjernes ved filtrering. Efter tørring opløses bundfaldet i 50 ml vand og føres gennem en kolonne på 2,5 x 20 cm af "Amberlite" CG-410 (fri base). Kolonnen vaskes grundigt med 30% vandigt metanol. Effluenter og vaskeskæskerne forenes og koncentrerer under nedsat tryk til fjernelse af metanolen efterfulgt af frysetørring. Den beskrevne procedure giver 3,1 g af den frie base af H-D-Leu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃.

$R_f^2 = 0,24$, $R_f^3 = 0,68$. I 4 ml dimetylformamid op-

løses 228 mg af det ovenfor vundne produkt og 290 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH efterfulgt af tilsætningen af 144 mg HONB. Blandingen afkøles til -10°C og der tilsættes 90 mg DCC. Blandingen omrøres ved -10°C i 2 timer, ved 0°C i 4 timer og ved stuetemperatur i 4 timer. Reaktionsblandingen filtreres til fjernelse af dicyklohexylurinstoffet. Efter at der er sat ætylacetat til filtratet opsamles det resulterende bundfald ved filtrering. Bundfaldet tørres og opløses i 20% vandig ætanol. Opløsningen føres gennem en kolonne af "Amberlite" XAD-2 (20 mesh, 3 x 20 cm) og der foretages gradienteluering med 20% ætanol og absolut ætanol (300 ml af hver).

Det ønskede produkt kommer frem i fraktionerne fra 260 ml til 360 ml. Disse fraktioner koncentrerer under nedsat tryk og frysetørres. Proceduren giver 346 mg af det ønskede produkt.

$$\alpha_{\text{D}}^{25} = 38,28^{\circ} \text{ (c = 0,1 i 0,5\% metanol); } R_f^2 = 0,235, R_f^3 = 0,765$$

c) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 20 ml 60% vandig myresyre opløses 300 mg af den i eksempel 1 b) vundne NO₂-forbindelse hvorefter der tilsættes 600 mg SnCl₂·H₂O. Blandingen opvarmes til $80-85^{\circ}\text{C}$ i 2 timer hvorefter den koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen ekstraheres med 50 ml varmt vand (80°C). Ekstrakten filtreres og filtratet føres gennem en kolonne (3 x 20 cm) af "Amberlite" XAD-2 (200 mesh). Efter vask med vand gennemføres gradienteluering med vand og absolut ætanol (400 ml af hver). Det ønskede produkt fremkommer i fraktionerne 150 ml til 260 ml. Disse fraktioner forenes og koncentrerer under nedsat tryk til fjernelse af ætanol. Koncentratet føres gennem en kolonne (2 x 33 cm) af karboxymethylcellulose og der gennemføres gradienteluering med 0,005M til 0,2M ammoniumacetat (pH = 6,8). Det ønskede peptid fremkommer i fraktionerne 330 ml til 520 ml. Disse fraktioner forenes og frysetørres hvorved der vindes 284 mg af et hvidt fnugget pulver.

$$\alpha_{\text{D}}^{24} = 32,66^{\circ} \text{ (c = 0,545 i 5\% vandig eddikesyre); } R_f^2 = 0,10, R_f^3 = 0,75$$

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 1,00, Arg 0,96, Trp 0,96, Ser 1,00, Glu 1,00,

Pro 1,04, Leu 2,00, Tyr 1,00.

Eksempel 2

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr- α -Aibu-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) Z- α -Aibu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 7 ml dimetylformamid opløses 0,6 g Z- α -Aibu-OH og 0,9 g H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃. Opløsningen afkøles til 0°C og der tilsættes 0,71 g 1-ætyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimid, et vandopløseligt karbodiimid, hvorefter det omrøres i 12 timer. Opløsningsmidlet afdestilleres og remanensen opløses i 100 ml kloroform. Opløsningen vaskes med 4% natriumhydrogenkarbonat og 1N saltsyre, skylles med vand og tørres over magnesiumsulfat. Opløsningsmidlet afdestilleres under nedsat tryk og remanensen behandles med æter hvorved der vindes et pulver som opsamles ved filtrering.

Pulveret genudfældes fra ætylacetat/æter hvorved der vindes 473 mg af den ønskede forbindelse. Smp. 104-107°C.

$\alpha_D^{24} = -45,8^\circ$ (c = 0,55 i DMF), $R_f^1 = 0,50$.

Beregnet for C₃₁H₅₀O₈N₉·0,5H₂O:

	C 54,28,	N 7,50,	N 18,38
Fundet:	C 54,32,	N 7,32,	N 17,97%.

b) BOC-Tyr(Bzl)- α -Aibu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 3 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 423 mg Z- α -Aibu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og blandingen hvirvledes rundt ved stuetemperatur i 40 minutter hvorefter der tilsættes 50 ml tør æter.

Det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og tørres under nedsat tryk over natriumhydroxyd i en eksikkator. Det vundne pulver opsamles i 3 ml DMF og opløsningen neutraliseres med 0,24 ml N-ætylmorfolin og afkøles til 0°C. Derefter

sættes 557 mg BOC-Tyr(Bzl)-OH og 298 mg HONB til opløsningen hvorefter der tilsættes 280 mg DCC. Blandingen omrøres ved stuetemperatur i 6 dage. Dicyklohexylurinstoffet filtreres fra og DMF destilleres af under nedsat tryk. Remanensen opløses i 100 ml kloroform, vaskes med 1N saltsyre og 4% natriumhydrogenkarbonat, skylles med vand og tørres over magnesiumsulfat hvorefter der koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen krystalliseres fra ætylacetat. Udbytte 275 mg, smp. 227-229°C. $\alpha_D^{24} = -27,6^\circ$ ($c = 0,54$ i DMF), $R_f^1 = 0,60$.

Beregnet for $C_{44}H_{67}O_{10}N_{10} \cdot H_2O$:

	C 57,82,	H 7,61,	N 15,32
Fundet:	C 58,32,	H 7,51,	N 15,10%.

c) BOC-Ser-Tyr(Bzl)- α -Aibu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 3 ml trifluoreddikesyre indeholdende 0,1 ml anisol opløses 250 mg BOC-Tyr(Bzl)- α -Aibu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og opløsningen hvirvles rundt ved stuetemperatur i 30 timer. Der tilsættes 30 ml tør æter og det resulterende bundfald fjernes ved filtrering og tørres. Det vundne pulver opløses i 5 ml DMF og opløsningen neutraliseres med 0,08 ml N-ætylmorfolin. Derefter sættes 150 mg BOC-Ser-triklorfenyl-ester til opløsningen som omrøres i 2 dage. DMF afdestilleres og remanensen behandles med æter hvorved der vindes et pulver. Pulveret opsamles ved filtrering og genudfældes 2 gange fra ætylacetat. Udbytte 100 mg; smp. 140-142°C (sønderdeling); $\alpha_D^{25} = 34,8^\circ$ ($c = 0,44$ i DMF); $R_f^1 = 0,74$.

Beregnet for $C_{47}H_{72}O_{12}N_{11} \cdot 3H_2O$:

	C 54,43,	H 7,58,	N 14,84
Fundet:	C 54,66,	H 7,45,	N 14,91%.

d) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr- α -Aibu-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 3 ml trifluoreddikesyre indeholdende 0,1 ml anisol opløses 77 mg BOC-Ser-Tyr(Bzl)- α -Aibu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og opløsningen hvirvledes rundt ved stuetemperatur i 30 minutter. Der tilsættes 30 ml tør æter og det resulterende

bundfald opsamles ved filtrering og tørres. Det resulterende pulver opløses i 3 ml DMF og opløsningen neutraliseres med 0,21 ml 10% opløsning af N-ætylmorfolin i DMF. Hertil sættes 37 mg krystaller af (Pyr)Glu-His-Trp-OH og blandingen afkøles til -10°C hvorefter der tilsættes 21 mg HONB og 30 mg DCC. Blandingen omrøres ved 0°C i 12 timer. Dicyklohexylurinstoffet frafiltreres og filtratet koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen opløses i 20% ætanol og adsorberes på en kolonne (1 x 10 cm) af "Amberlite" XAD-2. Der gennemføres eluering ved gradientmetoden under anvendelse af fra 20% til absolut ætanol (200 ml af hver). De fraktioner der er rige på den ønskede forbindelse, svarende til koncentrationsområdet for ætanol på 40% til 80%, forenes, koncentrerer under nedsat tryk og frysetørres. Den beskrevne procedure giver 30 mg beskyttet nonapeptid ($R_f^2 = 0,31$). Ved tilsætning af 0,1 ml anisol og 0,1 ml merkaptoætanol behandles dette beskyttede nonapeptid med 3 ml vandfrit hydrogenfluorid og blandingen omrøres ved 0°C i 60 minutter. Hydrogenfluoridet afdestilleres under nedsat tryk og remanensen opløses i 10 ml vand. Opløsningen ekstraheres 3 gange med 2 ml æter og vandlagene forenes og føres gennem en kolonne (2 x 4 cm) af "Amberlite" CG-410 (acetatform) som vaskes med vand. Effluenten og vandige vaskevæsker forenes og føres gennem en kolonne af karboxymetylcellulose og en kolonne af "Amberlite" XAD-2 som beskrevet i eksempel 1. Efter frysetørring vindes 14 mg af et hvidt fnugget pulver.

$\alpha_D^{27} = -54,1^{\circ}$ ($c = 0,31$ i 5% vandigt eddikesyre), $R_f^2 = 0,99$, $R_f^3 = 0,715$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af thio-glykolsyre): His 0,49, Arg 0,97, Trp 0,81, Ser 1,06, Glu 0,97, Pro 0,97, Leu 1,03, Tyr 1,03, α -Aibu 1,00.

Eksempel 3

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-OH

I 100 ml metanol opløses 4,0 g Z-Ser-Phe-OMe og det

reduceres ved atmosfærisk tryk under anvendelse af 500 mg palladiumsort som katalysator i 1 1/2 time. Katalysatoren fjernes ved filtrering og metanolen afdestilleres straks under nedsat tryk. Remanensen opløses i 25 ml DMF og der tilsættes 4,1 g krystaller af (Pyr)Glu-His-Trp-OH. Blandingen køles til -5°C hvorefter der tilsættes 3,8 g HONB og 3 g DCC. Blandingen omrøres ved -5°C i 2 timer, ved 0°C i 2 timer og til sidst ved stuetemperatur i 8 timer. Det som biprodukt dannede dicyklohexylurinstof filtreres fra og filtratet koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen behandles med ætylacetat og det vundne pulver opsamles ved filtrering (6,7 g). Dette pulver opløses i 30 ml 15% metanol/kloroform og opløsningen føres gennem en kolonne (6 x 12 cm) af silikagel præpareret med 15% metanol/kloroform.

Der gennemføres eluering under anvendelse af 600 ml 15% metanol/kloroform, 1 l 25% metanol/kloroform og 1 l 30% metanol/kloroform. Fraktionerne mellem 400 ml 25% metanol/kloroform og 700 ml 30% metanol/kloroform forenes og koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen behandles med ætylacetat og det fremkomne pulver opsamles ved filtrering. Proceduren giver 4,2 g af den ønskede forbindelse. $R_f^2 = 0,29$.

I 20 ml metanol suspenderes 3,5 g af denne metylester og ved 0°C tilsættes 8 ml 1N natriumhydroxyd. Blandingen omrøres i en time hvorefter den neutraliseres med 8 ml 1N saltsyre. Metanolen afdestilleres under nedsat tryk og der tilsættes 20 ml koldt vand. Det resulterende bundfald opsamles ved filtrering, vaskes med afkølet vand og derpå med ætanol/æter i forholdet 4:6 hvorpå det tørres. Proceduren giver 2,32 g af den ønskede forbindelse. $\alpha_D^{26,5} = -3,3^\circ$ (c = 0,55 i iseddikesyre), $R_f^3 = 0,61$.

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 4 ml DMF opløses 290 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-OH og 228 mg H-D-Leu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ hvorefter der tilsættes 140 mg HONB. Blandingen afkøles til -10°C hvorefter der tilsættes 90 mg DCC. Blandingen omrøres ved -10°C i

2 timer, ved 0°C i 3 timer og til sidst ved stuetemperatur i 5 timer.

På nøjagtig samme måde som beskrevet i eksempel 1 under kastes denne reaktionsblanding søjlekromatografi på "Amberlite" XAD-2. Den beskrevne procedure giver 342 mg af den ønskede forbindelse.

$\alpha_D^{25} = -41,74^\circ$ ($c = 0,115$ i metanol); $Rf^2 = 0,265$, $Rf^3 = 0,78$

I 20 ml 60% vandig opløsning af myresyre opløses 300 mg af det ovenfor vundne produkt hvorefter der tilsættes 600 mg $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Blandingen henstår ved 80-85°C i 2 timer hvorefter den koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Derefter bliver koncentratet på nøjagtig samme måde som beskrevet i eksempel 1 rensat ved hjælp af en søjle af "Amberlite" XAD-2 og en søjle af karboxymetylcellulose. Proceduren giver 211 mg af et hvidt fnugget pulver.

$\alpha_D^{24} = -38,49^\circ$ ($c = 0,53$ i 5% vandigt eddikesyre), $Rf^2 = 0,12$, $Rf^3 = 0,74$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 1,00, Arg 1,04, Trp 0,98, Ser 0,92, Glu 1,00, Pro 1,00, Leu 1,98, Phe 1,00

Eksempel 4

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Phg-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂CH₃

a) Z-D-Phg-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I en blanding af 10 ml dimetylformamid og 20 ml diklormetan opløses 580 mg Z-D-Phg-OH og 1,14 g H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃.

Til denne blanding sættes 400 mg HONB og under afkøling med is tilsættes 500 mg DCC. Blandingen omrøres ved stuetemperatur i 4 timer. Det som biprodukt dannede dicyklohexylurinstof frafiltreres og filtratet koncentrerer til tørhed. Remanensen opløses i 100 ml ætylacetat. Opløsningen vaskes med 4% natriumhydrogenkarbonat og vand, tørres over natriumsulfat og destilleres til afdampning af ætylacetat. Remanensen genudfældes fra ætylacetat/petroelumsæter hvorved der vindes 1,4 g af

et pulver $Rf^1 = 0,65$, $Rf^2 = 0,83$, $\alpha_D^{25} = -80,2^\circ$ ($c = 0,5$ i metanol).

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Phg-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 20 ml eddikesyre opløses 150 mg Z-D-Phg-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃. Med tilsætning af 100 mg palladiumsort bobles hydrogengas gennem opløsningen ved atmosfærisk tryk til fremkaldelse af reduktion.

Efter 4 timer filtreres katalysatoren fra og der tilsættes 0,4 ml 1N saltsyre. Opløsningen koncentrerer til tørhed under nedsat tryk og koncentratet opløses i 20 ml vand og frysetørres. Det fremkomne pulver opløses i 8 ml dimetylformamid og der tilsættes dråbevis 0,25 ml af en 10% opløsning af N-ætylmorfolin i dimetylformamid. Derefter tilsættes der 141 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH hvorefter der tilsættes 50 mg 1-hydroxybenzotriazol og derpå 40 mg DCC ved -5°C .

Blandingen omrøres ved -5°C i 2 timer, ved 0°C i 2 timer og ved stuetemperatur i 8 timer. Der sættes æter til reaktionsblandingen og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og opløses i 20 ml vand. De uopløselige bestanddele filtreres fra og filtratet føres gennem en kolonne af "Amberlite" IRA-410 (acetatform) som derefter vaskes med vand. Effluenten og de vandige vaskevæsker forenes og føres gennem en kolonne på $1,5 \times 25$ cm af karboxymetylcellulose og der gennemføres gradienteluering under anvendelse af 300 ml 0,005M ammoniumacetat og 300 ml 0,175M ammoniumacetat (pH 6,8). Det ønskede produkt fremkommer i fraktionerne fra 170 ml til 240 ml. Disse fraktioner forenes og føres gennem en kolonne på 2×20 cm af "Amberlite" XAD-2. Den adsorberede forbindelse elueres ved gradientmetoden under anvendelse af 250 ml vand og 280 ml ætanol hvorpå den rene forbindelse fremkommer i fraktionerne fra 190 ml til 240 ml. Eluatet koncentrerer under nedsat tryk og frysetørres. Den beskrevne metode giver 110 mg af det ønskede produkt. $Rf^2 = 0,098$, $Rf^3 = 0,73$, $\alpha_D^{24} = -57,0^\circ$ ($c = 0,56$ i 5% vandigt eddikesyre) Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 0,96, Arg 1,04, Trp 0,92, Ser 0,93, Glu 1,00, Pro 1,00, Leu 1,01, Phg 0,98, Tyr 1,01.

Eksempel 5

 (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) Z-D-Ser-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I en blanding af 10 ml dioxan og 10 ml dimetylformamid opløses 955 mg Z-D-Ser-OH, 1,82 g H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og 788 mg HONB. Opløsningen afkøles til 0°C og der tilsættes 907 mg DCC. Blandingen omrøres ved 0°C i 2 timer og ved stuetemperatur i 5 timer. Det som biprodukt dannede dicyklohexylurinstof frafiltreres og filtratet koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen opløses i 100 ml kloroform. Opløsningen vaskes med 0,5N saltsyre og 4% natriumhydrogenkarbonat i den nævnte rækkefølge, tørres over magniumsulfat og koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen behandles med petroleumsæter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering og genudfældes fra ætanol/æter. Udbytte 2,4 g; smp. 123-126°C (sønderdeling), $\alpha_D^{27} = -49,8^\circ$ (c = 0,5 i metanol)

Beregnet for C₃₀H₄₇O₉N₉,H₂O:

	C 51,79,	H 7,09,	N 18,12
Fundet:	C 52,01,	H 6,96,	N 18,04%

Rf¹ = 0,40

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I en blanding af 20 ml metanol og 1 ml iseddikesyre opløses 334 mg Z-D-Ser-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og med palladium-sort som katalysator gennemføres katalysereduktion ved stuetemperatur og atmosfærisk tryk i 4 timer. Katalysatoren frafiltreres og filtratet koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen opløses ved tilsætning af 9,6 ml 0,1N saltsyre hvorpå den frysetørres.

Det tørre pulver og 280 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH opløses i 3 ml DMF og der tilsættes 100 mg 1-hydroxybenzotriazol og 0,615 ml af en 10% opløsning af N-ætylmorfolin i DMF.

Blandingen afkøles til -5°C hvorefter der tilsættes 165 mg DCC. Blandingen omrøres ved -5°C i 4 timer og ved stuetemperatur i 8 timer. Det som biprodukt dannede urin-stofderivat frafiltreres og filtratet koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen opløses i 20 ml vand og de uopløselige bestanddele frafiltreres. Filtratet føres gennem en kolonne (10 ml) af "Amberlite" IRA-410 (acetatform) og efflu-enten og vaskevæskerne forenes og føres gennem en kolonne på $1,5 \times 27$ cm af karboxymetylcellulose. Der gennemføres elue-ring ved gradientmetoden under anvendelse af 300 ml 0,005M ammoniumacetatpuffer og 300 ml 0,15M ammoniumacetat. Den øn-skede forbindelse fremkommer i fraktionerne fra 280 til 322 ml. Disse fraktioner forenes og frysetørres hvorved der vindes 135 mg råprodukt. Dette opløses i en lille mængde vand og an-bringes på en kolonne på $1,5 \times 17$ cm af "Amberlite" XAD-2. Der gennemføres eluering ved gradientmetoden under anvendelse af 300 ml 5% vandigt ætanol og 330 ml 60% vandigt ætanol. Frak-tionerne fra 196 ml til 231 ml forenes og efter fjernelse af ætanol ved destillation frysetørres remanensen. Udbytte 62 mg.

Dette produkt opløses i 0,1N vandig eddikesyre og underkastes gelfiltrering på en kolonne på 1×54 cm af "Sephadex" LH-20. Efter frysetørring vindes 40 mg af det øn-skede produkt i ren tilstand.

$\alpha_{\text{D}}^{27} = -46,4^{\circ}$ ($c = 0,5$ i vandigt eddikesyre), $R_f^2 = 0,055$,
 $R_f^3 = 0,70$

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tio-glykolsyre) His 1,00, Arg 1,04, Trp 1,00, Ser 1,81, Glu 1,00, Pro 1,00, Leu 1,04, Tyr 0,96, ætylamin 1,04

Eksempel 6

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Abu-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂CH₃

a) Z-D-Abu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂CH₃

I 5 ml dimetylformamid opløses 0,3 g Z-D-Abu-OH og 0,45 g H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃.

Opløsningen afkøles til 0°C og der tilsættes 0,25 g HONB og 0,29 g DCC. Blandingen omrøres ved 0°C i en time og ved stuetemperatur i 5 timer. Urinstofderivatet frafiltreres og filtratet koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen opløses i 80 ml kloroform, vaskes med 1N saltsyre og 4% natriumhydrogenkarbonat.

Efter vask med vand tørres over magniumsulfat og der koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen behandles med æter og det resulterende pulver opsamles ved filtrering og genudfældes fra ætylacetat/petroleumsbenzin. Udbytte 489 mg, smp. 11-114°C. $\alpha_D^{26} = -51,2^\circ$ (c = 0,6 i metanol), $R_f^1 = 0,66$

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Abu-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

Z-D-Abu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ behandles med 25% hydrogenbromid/iseddikesyre og udfældes med æter. Bundfaldet føres gennem en kolonne af "Amberlite" CG-410 (fri base) til fjernelse af hydrogenbromidet. I 3 ml DMF opløses 220 mg af den således vundne frie base af H-D-Abu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og 290 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH hvorefter der tilsættes 150 mg HONB. Blandingen afkøles til -10°C og der tilsættes 85 mg DCC. Blandingen omrøres ved -10°C i 2 timer, ved 0°C i 4 timer og ved stuetemperatur i 7 timer. Til reaktionsblandingen sættes ætylacetat og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering. Bundfaldet opløses i 20% vandigt metanol under opvarmning og opløsningen afkøles hvorpå der udskiller sig et bundfald. Dette bundfald opsamles ved filtrering og tørres. Udbytte 284 mg, $R_f^2 = 0,240$, $R_f^3 = 0,772$ (i begge opløsningsmidler indeholder produktet ca. 10% urenheder som giver en lille R_f -værdi).

I 15 ml 60% vandigt myresyre opløses 200 mg af det ovenfor vundne produkt hvorefter der tilsættes 400 mg SnCl₂·H₂O. Blandingen opvarmes til 80-85°C i 2 timer. Derefter koncentrerer blandingen til tørhed under nedsat tryk og remanensen ekstraheres med 50 ml varmt vand.

De uopløselige bestanddele fjernes ved filtrering og filtratet føres gennem en kolonne af "Amberlite" XAD-2, carboxymethylcellulose "Sephadex" LH-20 i den nævnte rækkefølge hvorefter der frysetørres. Den beskrevne procedure giver 104 mg af et hvidt fnugget pulver.

$\alpha_D^{24} = -43,6^\circ$ ($c = 0,50$ i 5% vandigt eddikesyre), $R_f^2 = 0,08$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tiosglykolsyre): His 0,98, Arg 0,96, Trp 0,94, Ser 0,92, Glu 1,00, Pro 1,00, Leu 0,98, Abu 1,00, Tyr 1,00, ætylamin 1,02.

Eksempel 7

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nva-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) Z-D-Nva-OH

På den rutinemæssige måde omsættes H-D-Nva-OH med karbobenzooxyklorid i 2N natriumhydroxyd og den resulterende forbindelse omkrystalliseres fra ætylacetat/petroleumsbenzin. Proceduren giver nåle med smp. 83-84°C.

$\alpha_D^{26} = +12,1^\circ$ ($c = 1,0$ i metanol)

Beregnet for C₁₃H₁₇O₄N:

	C 62,14,	H 6,82,	N 5,57
Fundet:	C 62,17,	H 6,88,	N 5,62%.

b) Z-D-Nva-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 5 ml DMF opløses 376 mg Z-D-Nva-OH, 685 mg H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og 295 mg HONB og derefter ved 0°C 340 mg DCC. Blandingen omrøres ved 0°C i 2 timer og ved stuetemperatur i 8 timer. Det som biprodukt dannede urinstofderivat frafiltreres og der sættes 10 ml ætylacetat til filtratet. Blandingen vaskes med 0,5N saltsyre og 4% natriumhydrogenkarbonat. Der vaskes med vand og tørres over natriumsulfat. Opløsningen koncentrerer til tørhed under nedsat tryk og behandles med æter. Det resulterende pulver opsamles ved filtrering og renses ved genudfældning fra ætylacetat/æter. Udbytte 900 mg, smp. 105-107°C (sønderdeling), $\alpha_D^{26} = -51,2^\circ$ ($c = 1$ i metanol), $R_f^1 = 0,60$

Beregnet for C₃₂H₅₁O₈N₉:

	C 55,71,	H 7,45,	N 18,27
Fundet:	C 55,54,	H 7,62,	N 18,09%.

c) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nva-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

Ud fra det i eksempel 7 b) vundne Z-D-Nva-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH følges de samme reaktions-og rensningsmetoder som beskrevet i eksempel 6 b) hvorved man vinder den ønskede forbindelse.
 $\alpha_D^{25} = -39,8^\circ$ (c = 0,51 i 5% vandigt eddikesyre), $R_f^2 = 0,094$, $R_f^3 = 0,74$

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre) His 1,00, Arg 0,98, Trp 0,93, Ser 0,94, Glu 1,08, Pro 1,02, Nva 0,98, Leu 1,00, Tyr 0,98, ætylamin 1,04.

Eksempel 8

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-D-Nva-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₂-CH₃

a) Z-D-Nva-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₂-CH₃

I 2 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 720 mg Z-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₂-CH₃ og opløsningen rystes i 40 minutter. Til opløsningen sættes 20 ml tørt æter og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering. Bundfaldet vaskes grundigt med tør æter. Derefter tørres det over natriumhydroxyd under nedsat tryk i en eksikkator.

Efter tørring opløses produktet i 5 ml DMF og der tilsættes 250 mg Z-D-Nva-OH hvorefter der tilsættes 0,15 ml triætylamin og 200 ml HONB. Blandingen afkøles til 0°C og der tilsættes 230 mg DCC hvorefter der omrøres ved stuetemperatur i 8 timer. Der tilsættes 80 ml ætylacetat og de uopløselige bestanddele frafiltreres. Filtratet vaskes med 1N saltsyre, 4% natriumhydrogenkarbonat og vand og tørres over natriumsulfat.

Derefter koncentrerer det til tørhed under nedsat tryk og remanensen behandles med petroleumsæter. Det resulterende pulver renses ved genudfældning fra ætylacetat/petroleumsæter. Udbytte 718 mg, $\alpha_D^{25} = -51,0^\circ$ (c = 1,0 i metanol), $R_f^1 = 0,64$.

Beregnet for $C_{33}H_{53}O_8N_9$:

C 56,23, H 7,58, N 17,89

Fundet: C 56,14, N 7,70, N 17,58%.

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-D-Nva-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₂-CH₃

I 3 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 500 mg Z-D-Nva-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₂-CH₃ og opløsningen rystes i 50 minutter. Til opløsningen sættes 60 ml tør æter og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og opløses i 40 ml vand. Opløsningen føres gennem en kolonne på 1 x 14 cm af "Amberlite" CG-410 (fri base) som derefter vaskes med 30% vandigt metanol. Effluenten og vaskevæsker forenes og metanolen afdestilleres under nedsat tryk. Remanensen frysetørres hvorved der vindes 320 mg af den frie base af H-D-Nva-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₂-CH₃. I 2 ml DMF opløses 225 mg af det ovenfor vundne produkt og 280 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-OH hvorefter der tilsættes 130 mg HONB. Blandingen afkøles til -10°C og der tilsættes 87 mg DCC. Blandingen omrøres ved -10°C i 60 timer. Ved 0°C i 2 timer og ved stuetemperatur i 6 timer. Til denne reaktionsblanding sættes 40 ml ætylacetat og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og opløses i 30% vandigt ætanol under opvarmning. De uopløselige bestanddele frafiltreres og filtratet afkøles hvorved der vindes et bundfald. Bundfaldet opsamles ved filtrering, vaskes med koldt vand og tørres. Udbytte 340 mg. I 20 ml 60% vandig myresyre opløses 300 mg af det ovenfor vundne produkt hvorefter der tilsættes 580 mg SnCl₂·H₂O. Blandingen opvarmes til 85°C i 2 timer. Reaktionsblandingen koncentrerer til tørhed under nedsat tryk og ekstraheres med varmt vand.

Ekstrakten renses ved kromatografi på "Amberlite" XAD-2, karboxymethylcellulose og "Biogel" P-2. Proceduren giver 170 mg af det ønskede produkt.

$\alpha_{D}^{25} = -37,7^\circ$ (c = 0,505 i 5% vandig eddikesyre), $R_f^2 = 0,13$,
 $R_f^3 = 0,76$

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 1,02, Arg 0,98, Trp 0,97, Ser 0,98, Glu 1,02, Pro 1,00, Leu 1,00, Nva 1,02, Phe 0,98.

Eksempel 9

 (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Abu-Leu-Arg-Pro-NH-CH(CH₃)₂

a) Z-D-Abu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH(CH₃)₂

I 3 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 700 mg Z-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH(CH₃)₂ og opløsningen omrystes i 60 minutter hvorefter der tilsættes 50 ml tør æter. Det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og tørres. Det tørrede produkt opløses i 6 ml DMF. Til denne opløsning sættes 240 mg Z-D-Abu-OH og opløsningen neutraliseres med 0,15 ml triætylamin.

Derefter tilsættes 200 mg HONB og blandingen afkøles til 0°C hvorefter der tilsættes 230 mg DCC. Blandingen omrøres ved stuetemperatur i 6 timer. Til blandingen sættes 100 ml ætylacetat og de uopløselige bestanddele frafiltreres. Filtratet vaskes med 0,5N saltsyre og 4% natriumhydrogenkarbonat hvorefter det tørres over natriumsulfat. Derefter koncentrerer det til tørhed under nedsat tryk og behandles med æter. Det resulterende pulver genudfældes fra ætylacetat/æter. Udbytte 725 mg.

$\alpha_D^{25} = -52,0^\circ$ (c = 0,5 i metanol), $R_f^1 = 0,62$

Beregnet for C₃₂H₅₁O₈N₉:

	C 55,71,	H 7,45,	N 18,27
Fundet:	C 55,42,	H 7,59,	N 18,01%

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Abu-Leu-Arg-Pro-NH-CH(CH₃)₂

Ud fra det i eksempel 9 a) vundne Z-D-Abu-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH(CH₃)₂ og (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH vindes den i overskriften angivne forbindelse ved nøjagtig samme procedure som den der er beskrevet i eksempel 5.

$\alpha_D^{26} = -41,0^\circ$ (c = 0,62 i 5% vandigt eddikesyre), $R_f^2 = 0,11$,
 $RF^3 = 0,74$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 1,00, Arg 0,90, Trp 0,87, Ser 0,97, Glu 1,00, Pro 0,94, Abu 1,00, Leu 1,02, Tyr 0,96

Eksempel 10

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃, fremstilling
i fast fase

a) BOC-Pro-harpiks

I 50 ml DMF anbringes 15 g klormetyleret harpiks (Cl-indhold 9,45 mmol) hvorefter der tilsættes 6,1 g BOC-Pro-OH og 3,33 ml triætylamin. Blandingen rystes i 5 dage. Harpiksen opsamles ved filtrering og vaskes grundigt med DMF, ætanol, vand, ætanol og æter i den nævnte rækkefølge hvorpå den tørres. Udbytte 17,55 g. Aminosyreanalyse afslører at denne harpiks indeholder 0,314 mmol/g BOC-Pro.

b) (Pyr)Glu-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-D-Leu-Leu-Arg(Tos)-Pro-harpiks

Reaktionsbeholderen til et automatisk peptidsynteseapparat (Simadzu Seisakusho model "APS-800" ^(R)) fyldes med 3,145 g af den i eksempel 10 a) vundne BOC-Pro-harpiks. Harpiksen kvældes med diklormetan i 12 timer hvorefter hver aminosyre tilføjes i den følgende cyklus.

Diklormetan (3 minutter x 3) → 50% trifluoredikesyre/diklormetan (10 minutter og 30 minutter) → diklormetan (3 minutter x 3) → ætanol (3 minutter x 3) → diklormetan → (3 minutter x 3) → 10% triætylamin/kloroform (10 minutter) → kloroform (3 minutter x 3) → diklormetan (3 minutter x 2) → BOC-aminosyre-anhydrid (syntetiseret fra BOC-aminosyre og DCC på konventionel måde) (30 minutter og 60 minutter) → acetylering (diklormetan, triætylamin og eddikesyreanhydrid) (en time) → diklormetan (3 minutter x 3) [(Pyr)Glu-OH kondenseres direkte med DCC i DMF].

Til sidst vaskes harpiksen med ætanol, kloroform, dimetylformamid og æter hvorpå den tørres. Udbytte 3,89 g.

c) (Pyr)Glu-His(Tos)-Trp-Ser-(Bzl)-Tyr(Bzl)-D-Leu-Leu-Arg(Tos)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 20 ml metanol suspenderes 3,52 g af den i eksempel 10 b) vundne harpiks og suspensionen afkøles til 20°C. Ætylaminen der er vundet ved opvarmning af 80% vandigt ætylamin i et varmt vandbad bobles ind i suspensionen gennem natriumhydroxyd. Efter tilstrækkelig mætning omrøres blandingen ved stuetemperatur i 40 timer. Harpiksen opsamles ved filtrering og filtratet koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen behandles med æter hvorved der vindes 835 mg af et råt pulverformet produkt. Dette produkt indeholder en stor del urenhed som sandsynligvis er metylester. Derfor opløses 503 mg af dette produkt i metanol/DMF (8 ml/8 ml) og på samme måde som beskrevet ovenfor bobles der ætylamin ind i opløsningen. Opløsningen omrøres i 34 timer hvorved metylesteren forsvinder.

Derefter koncentrerer opløsningen til tørhed under nedsat tryk og remanensen behandles med æter. Det resulterende pulver opsamles ved filtrering. Udbytte 465 mg.

d) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I nærværelse af 0,4 ml anisol og 0,4 ml merkapto-ætanol opløses 327,8 mg af det i eksempel 10 c) vundne råprodukt i 8 ml vandfrit hydrogenfluorid. Opløsningen omrøres ved 0°C i en time hvorefter den koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen opløses i 20 ml vand og de uopløselige bestanddele frafiltreres. Filtratet føres gennem en kolonne på 1,5 x 20 cm af "Amberlite" IRA-410 (acetatform) og renses derpå ved kromatografi på karboxymetylcellulose og "Amberlite" XAD-2. Derefter underkastes produktet gelfiltrering på en kolonne af "Sephadex" LH-20. Den beskrevne procedure giver 98 mg af det ønskede produkt.

$\alpha_{D}^{26} = -32,0^{\circ}$ (C = 0,52 i 5% vandigt eddikesyre), $R_f^2 = 0,10$, $R_f^3 = 0,75$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 0,98, Arg 1,00, Trp 0,87, Ser 0,90, Glu 1,02, Pro 1,02, Leu 2,01, Tyr 0,98, ætylamin 1,10.

Eksempel 11

 (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nle-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) BOC-D-Nle-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 10 ml DMF opløses 346 mg BOC-D-Nle-OH og 820 mg H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃. Blandingen afkøles til 0°C hvorefter der tilsættes 322 mg HONB og 371 mg DCC. Blandingen omrøres ved 0°C i 2 timer og ved stuetemperatur natten over. Den som biprodukt dannede urinstofforbindelse fjernes ved filtrering og filtratet ekstraheres med 10 ml kloroform. Ekstrakten vaskes med 0,1N saltsyre, 5% natriumhydrogenkarbonat og vand, hvorefter den tørres over vandfrit natriumsulfat.

Kloroformen afdampes og remanensen tritureres med æter hvorved man vinder den ønskede forbindelse. Udbytte 811 mg, smp. 124-126°C (sønderdeling), $\alpha_D^{22} = -46,2^\circ$ (c = 0,5 i metanol) Beregnet for C₃₀H₅₅O₈N₉·1/2H₂O:

	C 53,08,	H 8,31,	N 18,57
Fundet:	C 53,07,	H 8,27,	N 19,05%.

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Nle-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

Det i eksempel 11 a) vundne BOC-D-Nle-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ behandles med trifluoreddikesyre og bundfældes med æter og opsamles ved filtrering. Produktet føres gennem en kolonne af "Amberlite" CG-45 (fri base) til fjernelse af trifluoreddikesyren. I 2 ml DMF opløses 190 mg af forbindelsen H-D-Nle-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og 168 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH. Blandingen afkøles til 0°C hvorefter der tilsættes 65 mg HONB og 75 mg DCC. Blandingen omrøres ved 0°C i 2 timer og ved stuetemperatur natten over. Den som biprodukt dannede urinstofforbindelse fjernes ved filtrering og der sættes ætylacetat til filtratet. Det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og behandles med 4 ml vandfrit hydrogenfluorid i nærværelse af 0,1 ml anisol og 0,1 ml 2-merkaptøtanol ved 0°C i en time. Hydrogenfluoridet afdampes under nedsat tryk og remanensen tørres grundigt

og opløses i 10 ml vand. Opløsningen føres over en kolonne af "Amberlite" IRA-410 (acetatform) og effluenten adsorberes på en kolonne af karboxymethylcellulose (1,2 x 22 cm) og der gennemføres gradienteluering med 200 ml 0,005M ammoniumacetat og 200 ml 0,15M ammoniumacetat. Fraktionerne fra 147 ml til 168 ml forenes og frysetørres hvorved det ønskede produkt vindes i fin-delt form. Udbytte 40 mg. $\alpha_D^{22} = -42,2^\circ$ ($c = 0,5$ i 5% vandigt eddikesyre), $Rf^2 = 0,11$, $Rf^3 = 0,755$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 1,05, Arg 1,00, Trp 0,93, Ser 0,89, Tyr 1,00, Glu 1,00, Pro 1,02, Leu 1,00, Nle 1,00, ætylamin 1,05.

Eksempel 12

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-D-Phe-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) H-D-Phe-Leu-Arg-(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

Til en blanding af 10 ml diklormetan og 1 ml DMF sættes 600 ml Z-D-Phe-OH, 500 mg HONB og 950 mg H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og blandingen opvarmes. Blandingen afkøles til 0°C og der tilsættes 500 mg DCC. Blandingen omrøres i 4 timer ved stuetemperatur og det som biprodukt dannede dicyklohexylurinstof fjernes ved filtrering. Filtratet koncentrerer til tørhed under nedsat tryk og remanensen opløses i kloroform. Opløsningen vaskes 2 gange med 4% natriumhydrogenkarbonat og 2 gange med vand og tørres over vandfrit magnesiumsulfat og koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Remanensen opløses øjeblikkeligt i 2 ml iseddikesyre. Efter tilsætning af 2 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre omrøres blandingen ved stuetemperatur i en time hvorefter der tilsættes 50 ml tør æter. Det udskilte bundfald opsamles ved filtrering, vaskes grundigt med æter og tørres. Bundfaldet opløses i 10 ml 30% vandig metanol. Opløsningen føres gennem en kolonne af "Amberlite" IRA-410 (fri form) som elueres med 100 ml 30% vandig metanol. Effluenten opsamles og koncentrerer til fjernelse af metanol.

Frysetørring af remanensen giver den ønskede forbindelse H-D-Phe-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ i form af et hvidt

pulver. Udbytte 1,67 g. $\alpha_D^{26} = -94,26^\circ$ ($c = 1,01$ i metanol)

Beregnet for $C_{23}H_{45}O_6N_9 \cdot H_2O$:

	C 54,09,	H 7,62,	N 20,28
Fundet:	C 53,84,	H 7,79,	N 19,91%.

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-D-Phe-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 6 ml DMF opløses 290 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-OH og 240 mg H-D-Phe-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ hvorefter der tilsættes 150 mg HONB. Blandingen afkøles til -10°C og der tilsættes 90 mg DCC. Blandingen omrøres ved -10°C i 2 timer, ved 0°C i 2 timer og ved stuetemperatur i 6 timer. Den som biprodukt dannede urinstofforbindelse fjernes ved filtrering og der sættes 40 ml æter til filtratet. Det udskilte bundfald opsamles ved filtrering. Genudfældning fra ætanol og ætylacetat giver et råt beskyttet peptid. Udbytte 510 mg. Det rå peptid opløses i 40 ml 60% vandig myresyre. Efter tilsætning af 1 g SnCl₂·H₂O til opløsningen henstår blandingen ved 80-85°C i 2 timer. Blandingen koncentrerer til tørhed under nedsat tryk. Efter tilsætning af 50 ml vand til remanensen indstilles blandingen til pH 7,0 med vandig ammoniakopløsning. Det udskilte bundfald fjernes ved filtrering. Filtratet renses på en kolonne af "Amberlite" XAD-2 og karboxymethylcellulose og frysetørres på samme måde som beskrevet i eksempel 1 hvorved den ønskede forbindelse vindes som et hvidt fnugget pulver. Udbytte 392 mg. $\alpha_D^{26} = -71,8^\circ$ ($c = 0,195$ i 5% vandigt eddikesyre), $Rf^2 = 0,14$, $Rf^3 = 0,76$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre)

His 0,98, Arg 1,00, Trp 0,97, Ser 0,93, Glu 1,00, Pro 0,98, Leu 1,00, Phe 1,96.

Eksempel 13

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Thr-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) BOC-D-Thr-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 10 ml acetonitril opløses 438 mg BOC-D-Thr-OH (et olieagtigt stof) og 418 mg HONB hvorefter der tilsættes 912 mg H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃. Blandingen afkøles til 0°C og derefter tilsættes 494 mg DCC. Blandingen omrøres ved stuetemperatur i 10 timer og de uopløselige bestanddele fjernes ved filtrering. Filtratet koncentrerer til tørhed under nedsat tryk og remanensen ekstraheres med 100 ml ætylacetat. Ekstrakten vaskes med 5% natriumhydrogenkarbonat, 10% vandig citronsyreopløsning og vand i den nævnte rækkefølge og tørres over vandfrit natriumsulfat. Derefter koncentrerer den til tørhed under nedsat tryk og remanensen genudfældes fra ætanol/æter. Proceduren giver 900 mg af den ønskede forbindelse. Smp. 119-121°C (sønderdeling), $\alpha_D^{24} = -38,6^\circ$ (c = 0,5 i metanol), $R_f^1 = 0,45$.

Beregnet for C₂₈H₅₁O₉N₉,H₂O:

	C 49,76,	H 7,90,	N 18,65
Fundet:	C 49,64,	H 7,70,	N 18,46%.

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Thr-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 10 ml trifluoreddikesyre opløses 657 mg BOC-D-Thr-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og opløsningen rystes i 40 minutter. Til opløsningen sættes 60 ml æter og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og opløses i 30 ml vand. Den vandige opløsning føres gennem en kolonne på 1 x 10 cm af "Amberlite" IR-45 (fri base) som derpå vaskes med 30% vandig metanol. Effluenten og vaskevaskerne forenes og koncentrerer til fjernelse af metanol under nedsat tryk. Remanensen frysetørres. Proceduren giver 471 mg D-Thr-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃. I 2 ml DMF opløses 167 mg af dette produkt og 175 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH hvorefter der tilsættes 67 mg HONB. Blandingen afkøles til -5°C og der tilsættes 77 mg DCC. Blandingen omrøres ved -5°C i 3 timer og derefter ved stuetemperatur i 10 timer. De uopløselige bestanddele frafiltreres og der sættes 50 ml ætylacetat til filtratet. Det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og genudfældes fra DMF/ætylacetat. Udbytte 290 mg. En portion på 160 mg af dette produkt opløses i 10 ml 60% vandig myresyre og med tilsætning af 400 mg SnCl₂,H₂O behandles opløsningen ved 80°C i 2 timer. Reaktionsblandingen

koncentreres til tørhed under nedsat tryk. Derpå tilsættes 10 ml vand og de uopløselige bestanddele filtreres fra. Filtratet renses ved kromatografi på "Amberlite" XAD-2, karboxymetylcellulose og "Biogel" P-2. Proceduren giver 65 mg af den ønskede forbindelse.

$\alpha_D^{22} = -37,4^\circ$ ($c = 0,5$ i 5% vandig eddikesyre), $Rf^2 = 0,12$,
 $Rf^3 = 0,68$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre):

His 1,00, Arg 0,97, Trp 0,94, Thr 1,03, Ser 0,90, Glu 1,00, Pro 1,06, Leu 1,06, Tyr 1,00, ætylamin 1,10.

Eksempel 14

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Ile-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) Z-Ile-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 12 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 1,43 g Z-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og blandingen rystes i 40 minutter ved stuetemperatur. Til denne opløsning sættes 300 ml tør æter og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og tørres i en exsikkator over natriumhydroxyd. Det vundne pulver opløses i 25 ml DMF og opløsningen neutraliseres med 0,84 ml triætylamin og afkøles til 0°C. Derefter tilsættes 795 mg Z-Ile-OH, 590 mg HONB og 680 mg DCC og blandingen omrøres ved 0°C i 5 timer og ved stuetemperatur i 8 timer. Reaktionsblandingen filtreres og filtratet indampes. Remanensen opløses i 100 ml kloroform, vaskes med 0,1N saltsyre, 5% natriumhydrogenkarbonat og vand hvorefter den tørres over magniumsulfat. Efter afdampning af opløsningsmidlet udfældes remanensen fra ætylacetat/æter. Genudfældning fra ætanol/æter giver 1,1 g af det ønskede produkt med smp. 103-105°C.

$\alpha_D^{23} = -58,1^\circ$ ($c = 1,0$ i metanol), $Rf^1 = 0,48$

Beregnet for C₂₇H₄₂O₇N₈, 1/2H₂O:

	C 54,08,	H 7,23,	N 18,68
Fundet:	C 53,80,	H 7,15,	N 18,84%.

b) Z-D-Leu-Ile-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 4 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 590 mg Z-Ile-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og blandingen omrystes ved stuetemperatur i 40 minutter. Til denne opløsning sættes 50 ml tør æter og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og tørres i en eksikator over natriumhydroxyd. Det vundne pulver opløses i 8 ml DMF og opløsningen neutraliseres med 0,14 ml triætylamin og afkøles til 0°C. Derefter tilsættes 264 mg Z-D-Leu-OH, 216 mg HONB og 247 mg DCC og blandingen omrøres ved 0°C i 2 timer og ved stuetemperatur i 12 timer. Derefter behandles reaktionsblandingen på samme måde som beskrevet i eksempel 14 a) hvorved der vindes 620 mg af det ønskede produkt med smp. 112-113°C $\alpha_D^{23} = -47,8^\circ$ (c = 0,5 i metanol), $R_f^1 = 0,53$.

Beregnet for C₃₃H₅₃O₈N₉,H₂O:

	C 54,91,	H 7,68,	N 17,47
Fundet:	C 54,72,	H 7,52,	N 17,19%.

c) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Ile-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 3 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 220 mg Z-D-Leu-Ile-Arg(NO₂)-Pro-H-CH₂-CH₃ og opløsningen omrystes ved stuetemperatur i 50 minutter. Til denne opløsning sættes 50 ml tør æter og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og tørres i en eksikator over natriumhydroxyd. Dette materiale opløses i en lille mængde vand og føres gennem en kolonne på 1,2 x 7 cm af "Amberlite" IR-45 (fri form). Effluenten og vaskevæskerne forenes og frysetørres. Materialet opløses i 5 ml DMF sammen med 230 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH og 108 mg HONB. Blandingen afkøles til -10°C og der tilsættes 124 mg DCC. Blandingen omrøres ved -10°C i 2 timer, i 2 timer ved 0°C og i 10 timer ved stuetemperatur hvorefter den filtreres. Filtratet koncentrerer og remanensen renses på en kolonne på 1,8 x 20 cm af "Amberlite" XAD-2 (200-300 mesh) med gradienteluering med 250 ml 5% vandig ætanol og 250 ml 80% vandig ætanol. Det ønskede produkt fremkommer i fraktionerne fra 150 ml til 300 ml. Disse fraktioner koncentrerer under nedsat tryk og frysetørres. Det således vundne materiale opløses i 7 ml 60% vandig myresyre og der tilsættes 450 mg SnCl₂,H₂O. Blandingen opvarmes til

80-85°C i 2 timer. De uopløselige bestanddele filtreres fra og filtratet indampes til tørhed under nedsat tryk. Remanensen ekstraheres med 30 ml varmt vand (80°C). Ekstrakten filtreres og filtratet føres på en kolonne på 1,8 x 15 cm af "Amberlite" XAD-2 (200-300 mesh) og kolonnen vaskes grundigt med vand. Til eluering anvendes en lineær gradient af vandig ætanol (20-80%, 250 ml-250 ml). Den ønskede forbindelse fremkommer i fraktionerne fra 100 ml til 230 ml. Disse fraktioner forenes og koncentrerer under nedsat tryk til fjernelse af ætanol. Koncentratet føres gennem en kolonne på 1,2 x 40 cm af karboxymethylcellulose og derefter elueres produktet ved lineær gradienteluering (0,005M - 0,2M ammoniumacetat, pH 6,8, 200 ml-200 ml). Det ønskede peptid fremkommer i fraktionerne fra 180 ml til 280 ml. Disse fraktioner forenes og frysetørres. Udbytte 130 mg.

$\alpha_D^{23} = -39,2^\circ$ (c = 0,5 i 5% vandig eddikesyre), $R_f^2 = 0,11$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre).

His 0,97, Arg 1,02, Trp 0,92, Ser 0,94, Glu 1,00, Pro 1,05, Ile 1,00, Leu 1,00, Tyr 0,97.

Eksempel 15

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Nle-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) Z-Nle-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 10 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 715 mg Z-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og blandingen omrystes ved stuetemperatur i 30 minutter. Til denne opløsning sættes 250 ml tør æter og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og tørres i en eksikkator over natriumhydroxyd. Det således vundne pulver opløses i 15 ml DMF sammen med 400 mg Z-Nle-OH og opløsningen afkøles til 0°C. Til denne opløsning sættes 0,45 ml triætylamin og derefter 295 mg HONB og 340 mg DCC. Blanding omrøres ved 0°C i 3 timer og i 10 timer ved stuetemperatur. Derefter behandles reaktionsblandingen som beskrevet i eksempel 14-a) hvorved man vinder det ønskede produkt. Udbytte 824 mg, smp. 109-110°C.

$\alpha_D^{22} = -50,4^\circ$ ($c = 0,5$ i metanol), $Rf^1 = 0,41$

Beregnet for $C_{27}H_{42}O_7N_8,1/2H_2O$:

	C 54,08,	H 7,23,	N 18,68
Fundet:	C 53,79,	H 7,09,	N 18,34%.

b) Z-D-Leu-Nle-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 5 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 590 mg Z-Nle-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og blandingen rystes i 40 minutter ved stuetemperatur. Til denne opløsning sættes 200 ml tør æter og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og tørres i en eksikkator over natriumhydroxyd. Produktet opløses i 5 ml DMF og opløsningen neutraliseres med 0,14 ml triætylamin ved 0°C. Der tilsættes 264 mg Z-D-Leu-OH, 216 mg HONB og derefter 247 mg DCC ved 0°C. Blandingen omrøres i 2 timer ved 0°C og i 10 timer ved stuetemperatur og behandles derefter som beskrevet i eksempel 14-b) hvorved der vindes 594 mg af det ønskede produkt. Smp. 101-103°C.

$\alpha_D^{23} = -45,2^\circ$ ($c = 0,5$ i metanol), $Rf^1 = 0,55$

Beregnet for $C_{33}H_{53}O_8N_9, H_2O$:

	C 54,91,	H 7,68,	N 17,47
Fundet:	C 54,63,	H 7,54,	N 17,08%.

c) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Nle-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 4 ml 25% hydrogenbromid/iseddikesyre opløses 350 mg Z-D-Leu-Nle-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og blandingen omrystes i 40 minutter ved stuetemperatur. Til blandingen sættes 300 ml tør æter og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og tørres i en eksikkator over natriumhydroxyd.

Det således vundne materiale opløses i 200 ml vand og opløsningen føres gennem en kolonne på 1,2 x 7 cm af "Amberlite" IR-45 (fri form). Kolonnen vaskes grundigt med vand. Effluenter og vaskevæsker forenes og frysetørres. Dette produkt kobles med 345 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH i 6 ml DMF i nærværelse af 180 mg HONB og 206 mg DCC. Blandingen oparbejdes og det vundne produkt renses ved kromatografi på "Amberlite" XAD-2 som beskrevet i eksempel 14-c). Fjernelse af nitrogruppen

og rensning af den ønskede peptid kan også gennemføres på en måde svarende til den der er beskrevet i eksempel 14-c). Udbytte 213 mg. $\alpha_D^{23} = -38,6^\circ$ ($c = 0,5$ i 5% vandig eddikesyre), $Rf^2 = 0,10$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 0,98, Arg 1,00, Trp 0,91, Ser 0,95, Glu 1,00, Pro 1,08, Leu 1,00, Nle 1,00, Tyr 0,96.

Eksempel 16

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Val-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) BOC-D-Val-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

Til en opløsning af 540 mg BOC-D-Val-OH (olie) og 1,14 g H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ i 10 ml DMF sættes 537 mg HONB og 620 mg DCC ved 0°C. Blandingen omrøres i 3 timer ved 0°C og i 10 timer ved stuetemperatur hvorpå den filtreres. Filtratet indampes under nedsat tryk til tørhed og remanensen opløses i 100 ml ætylacetat. Opløsningen vaskes med 0,1N saltsyre, 5% natriumhydrogenkarbonat, tørres over vandfrit natriumsulfat og indampes. Remanensen tritureres med petroleumsæter hvorved der vindes et råprodukt som derefter genudfældes fra ætylacetat/æter. Udbytte 1,1 g, smp. 144-146°C (sønderdeling).

$\alpha_D^{23} = -43,7^\circ$ ($c = 1,0$ i metanol), $Rf^1 = 0,55$

Beregnet for C₂₉H₅₃O₈N₉, 1/2H₂O:

	C 52,39,	H 8,18,	N 18,96
Fundet:	C 52,40,	H 8,32,	N 18,52%.

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Val-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 5 ml trifluoreddikesyre opløses 300 mg BOC-D-Val-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og blandingen omrystes i 30 minutter ved stuetemperatur. Til opløsningen sættes 50 ml tør æter og det resulterende hvide faste stof opsamles og tørres under nedsat tryk i en exsikkator over natriumhydroxyd. Dette materiale opløses i 20 ml 20% vandig metanol og opløsningen føres til en kolonne

på 1 x 5 cm af "Amberlite" IR-45 (fri form). Kolonnen vaskes med det samme opløsningsmiddel. Effluenten og vaskevæskerne forenes, koncentreres til et lille rumfang og frysetørres. Udbytte 165 mg. Dette materiale (150 mg) opløses i 2 ml DMF sammen med 168 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH og 65 mg HONB og blandingen afkøles til 0°C. Derefter tilsættes 75 mg DCC og blandingen omrøres i 2 timer ved 0°C og i 12 timer ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen filtreres og fortyndes med 50 ml ætylacetat. Bundfaldet opsamles ved filtrering, tørres og renses ved søjlekromatografi på silikagel (4 g). Til eluering anvendes Rf²-opløsningsmiddelsystemet. De fraktioner der indeholder det beskyttede nonapeptid forenes og opløsningsmidlet afdampes til tørhed. Udbytte 140 mg. Dette beskyttede nonapeptid (110 mg) behandles med 4 ml vandfrit hydrogenfluorid i nærværelse af 0,1 ml anisol og 0,02 ml merkaptoætanol ved 0°C i en time. Hydrogenfluoridet fjernes under nedsat tryk og remanensen ekstraheres med 20 ml vand. Ekstrakten vaskes med æter og føres gennem en kolonne på 1,5 x 3 cm af "Amberlite" IRA-400 (acetatform) og kolonnen vaskes med vand. Effluenten og vaskevæskerne forenes og frysetørres. Materialet opløses i en lille mængde vand og opløsningen føres til en kolonne på 1,2 x 30 cm af karboxymethylcellulose. Til eluering anvendes en lineær gradient af ammoniumacetat (0,005M, 150 ml-150 ml). Det ønskede produkt fremkommer i fraktionerne på 110 ml til 130 ml. Disse fraktioner forenes og frysetørres. Udbytte 87 mg.

$\alpha_{D}^{23} = -40,8^{\circ}$ (c = 0,5 i 5% vandig eddikesyre), Rf² = 0,12, Rf³ = 0,66.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 1,00, Arg 1,02, Trp 0,85, Ser 0,95, Glu 0,98, Pro 1,02, Val 0,91, Leu 0,95, Tyr 1,00, ætylamin 1,01.

Eksempel 17

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Met-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) BOC-D-Met-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

BOC-D-Met-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ fremstilles

på en måde svarende til den der er beskrevet i eksempel 16-a) ud fra 623 mg BOC-D-Met-OH, 114 g H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃, 537 mg HONB og 620 mg DCC. Udbytte 1,1 g, smp. 125-130°C (sønderdeling)

$\alpha_D^{23} = -51,5^\circ$ (c = 1,0 i metanol), $R_f^1 = 0,59$

Beregnet for C₂₉H₅₃O₈N₉S:

	C 50,64,	H 7,77,	N 18,32,	S 4,65
Fundet:	C 50,51,	H 7,52,	N 18,54,	S 4,30%.

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Met-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 3 ml trifluoreddikesyre opløses 300 mg BOC-D-Met-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og blandingen omrystes i 20 minutter ved stuetemperatur. Til denne blanding sættes 40 ml tør æter og det resulterende hvide bundfald opsamles ved filtrering og tørres. Dette materiale omdannes til den frie form ved at føre igennem en kolonne på 1 x 5 cm af "Amberlite" IR-45 (fri form) som beskrevet i eksempel 16-b). Det resulterende delvis beskyttede tetrapeptid, H-D-Met-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ (147 mg) får lov til at reagere med 171 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH i nærværelse af 57 mg HONB og 77 mg DCC hvorved der vindes et delvist beskyttet nonapeptid. Denne forbindelse renses på en kolonne af "Amberlite" XAD-2 og behandles derefter med SnCl₂·H₂O i 60% vandig myresyre i 2 timer ved 80-85°C. Det således vundne slutprodukt renses ved kromatografi på "Amberlite" XAD-2 og karboxymethylcellulose. Alle disse procedurer er magen til dem der er beskrevet i eksempel 16-b). Udbytte 79 mg. $\alpha_D^{25} = -39,6^\circ$ (c = 0,5 i 5% vandig eddikesyre), $R_f^2 = 0,16$, Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 1,02, Arg 1,00, Trp 0,90, Ser 0,89, Glu 1,00, Pro 1,00, Met 0,91, Leu 0,98, Tyr 1,02, ætylamin 1,00.

Eksempel 18

(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ile-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

a) BOC-D-Ile-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃

BOC-D-Ile-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ fremstilles på en måde svarende til den der er beskrevet i eksempel 16-a) ud fra 579 mg BOC-D-Ile-OH, 1,14 g H-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃, 537 mg HONB og 620 mg DCC. Udbytte 0,9 g, smp. 127-131°C (sønderdeling).

$\alpha_D^{23} = -48,3^\circ$ (c = 1,0 i metanol)

Beregnet for C₃₀H₅₅O₈N₉:

	C 53,79,	H 8,27,	N 18,18
Fundet:	C 53,81,	H 8,31,	N 18,65%.

b) (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ile-Leu-Arg-Pro-NH-CH₂-CH₃

I 3 ml trifluoreddikesyre opløses 300 mg BOC-D-Ile-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ og blandingen rystes i 25 minutter ved stuetemperatur. Til denne blanding sættes 40 ml tør æter og det resulterende bundfald opsamles ved filtrering og tørres. Dette materiale omdannes til den frie form ved at føre det gennem en kolonne på 1,5 cm af "Amberlite" IR-45 (fri form) som beskrevet i eksempel 16-b). Det resulterende delvis beskyttede tetrapeptid, H-D-Ile-Leu-Arg(NO₂)-Pro-NH-CH₂-CH₃ (145 mg), får lov til at reagere med 171 mg (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH, 67 mg HONB og 77 mg DCC hvorved der vindes et delvis beskyttet nonapeptid. Denne forbindelse renses på en søjle af "Amberlite" XAD-2 og behandles derefter med SnCl₂·H₂O i 60% vandig myresyre i 2 timer ved 80-85°C. Det således vundne produkt renses ved kromatografi på "Amberlite" XAD-2 og karboxymetylcellulose. Alle disse procedurer svarer til dem der er beskrevet i eksempel 16-b). Udbytte 93 mg.

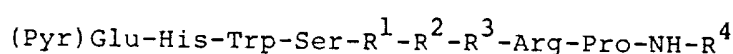
$\alpha_D^{25} = -41,5^\circ$ (c = 0,5 i 5% vandig eddikesyre), $R_f^2 = 0,13$
 $R_f^3 = 0,66$.

Aminosyreanalyse (hydrolyse med 6N HCl i nærværelse af tioglykolsyre): His 0,98, Arg 1,00, Trp 0,89, Ser 0,91, Glu 0,95, Pro 1,00, Ile 1,00, Leu 1,00, Tyr 1,00, ætylamin 1,01.

Biologisk forsøgsrapport -----

Der er foretaget en bestemmelse af de ifølge opfindelsen fremstillede forbindelsers ovulationsfremkaldende virkning ved anvendelse af den metode, der er beskrevet i J. Med. Chem. 16, 1144-1147, (1973), idet virkningen sammenlignes med virkningen af LH-RH = (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ og af en nært beslægtet, kendt LH-RH-analog.

Resultaterne fremgår af følgende tabel:



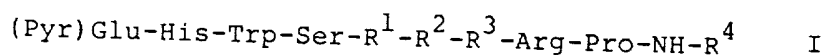
R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Ovulationsfremkaldende virkning (%) (LH-RH = 100)
Tyr	D-Abu	Leu	ætyl	6520
Tyr	D-Nva	Leu	ætyl	5810
Tyr	D-Leu	Leu	ætyl	8270
Tyr	D-Leu	Leu	metyl	1525
Tyr	D-Leu	Leu	propyl	3644
Phe	D-Leu	Leu	ætyl	4580
Tyr	D-Leu	Leu	isopropyl	2756
Tyr	D-Thr	Leu	ætyl	4135
Phe	D-Phe	Leu	ætyl	5400
Tyr	D-Ser	Leu	ætyl	6140
Tyr	D-Val	Leu	ætyl	3525
Tyr	D-Ser	Nle	ætyl	2760
Tyr	D-Leu	Ile	ætyl	4250
(*)	(Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NH-CH ₂ -CH ₃			500

Nva = norvalin, Nle = norleucin, Abu = aminosmørsyre,

(*) kendt forbindelse, Biochem.Biophys.Res.Comm. Bind 49, nr. 3, side 863-869 (1972).

P a t e n t k r a v -----

Analogifremgangsmåde til fremstilling af et LH-RH-analogt nonapeptidamidderivat med den almene formel



hvor R^1 er Tyr eller Phe, R^2 er D-Leu, D-Ile, D-Nle, D-Val, D-Nva, D-Abu, α -Aibu, D-Phe, D-Phg, D-Ser, D-Thr eller D-Met, R^3 er Leu, Ile eller Nle og R^4 er en alkylgruppe med 1-3 kulstofatomer som kan være substitueret med en hydroxylgruppe, eller et salt eller metalkompleks deraf, k e n d e t e g n e t ved at man kondenserer et reagens A - L-pyroglutaminsyre eller et peptidfragment som indeholder fra 1 til 9 aminosyrer af den ovennævnte aminosyresekvens, regnet fra den N-terminale ende, og som har en L-pyroglutaminsyreenhed (dvs. (Pyr)Glu-) i sin N-terminale ende - med et reagens B - en aminoforbindelse som svarer til den resterende del af det ovennævnte nonapeptidamidderivat -, hvilke reagenser A og B eventuelt er beskyttede, hvorefter man fjerner eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgrupper og om ønsket omdanner det dannede produkt til et salt eller et metalkompleks deraf.

Fremdragne publikationer:

Biochem.Biophys.Res.Comm., bind 49, nr. 3, 1972, side 863-869.