



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149611 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 2746/80

(51) Int.Cl.⁴: C 07 K 5/08

(22) Indleveringsdag: 26 jun 1980

(41) Alm. tilgængelig: 29 dec 1980

(44) Fremlagt: 11 aug 1986

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: 28 jun 1979 HU RI-717

(71) Ansøger: *RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR RT.; Budapest, HU.

(72) Opfinder: Lajos *Kisfaludy; HU, Tamas *Szirtes; HU, Lajos *Balaspiri; HU, Eva *Palosi; HU, Laszlo

*Szporny; HU, Adam *Sarkadi; HU.

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af TRH-analoge tripeptidamider eller terapeutisk acceptable komplekser eller salte deraf

(57) Sammendrag:

forhøjet grad. Forbindelserne kan således hæmme haloperidol-fremkaldt katalepsi, potentiere lokomotorisk aktivitet bevirket af L-dopa, reversere hypotermi fremkaldt af forskellige lægemidler og nedsætte varigheden af søvn fremkaldt af barbiturater eller etanol.

2746-80

Fremstilling af tripeptidamider med den almene formel Glp-X-Y-NH-A , hvor enten X betegner L-norleucyl, L-leucyl, L-norvalyl, D-leucyl, L-prolyl, L-2-aminobutyryl, L-valyl, L-treonyl, L-isoleucyl, L-2-aminodekanoyl, L-cyklohexylalanyl eller L-t-butylseryl og Y L-prolyl, eller X betegner L-histidyl og Y L-homoprolyl eller D-pipecolyl, og hvor A betegner hydrogen, C_{1-10} alkyl eller dimetylaminosubstitueret C_{1-3} alkyl, dog således at X ikke kan være L-leucyl hvis A er hydrogen, ved i og for sig velkendte peptidkemiske metoder.

Disse tripeptidamider er analoger til det kendte tyro-pinfrigivende hormon (TRH ; Glp-His-Pro-NH_2), hvor L-histidylgruppen i stilling 2 eller L-prolylgruppen i stilling 3 er erstattet med en anden aminosyre; i disse analoger er hormonavirkningen stærkt nedsat eller helt bortfaldet, mens de har TRHs virkninger på centralnervesystemet, i mange tilfælde i

LN 149611 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte TRH-analoge tripeptidamider som virker på det centrale nervesystem og som har den i indledningen til krav 1 viste almene formel I, hvor X og A har de sammesteds angivne betydninger, eller terapeutisk acceptable komplekser eller salte deraf. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

Disse nye tripeptidamider med den almene formel I er analoger til det såkaldte tyrotropinfrigivende hormon (TRH), der er L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid (Glp-His-Pro-NH₂), idet en aminosyre, nemlig den i stilling 2 stående L-histidylgruppe er udskiftet med en anden aminosyre svarende til foranstående definitioner.

Eksistensen af TRH kendtes allerede i 1960'erne, men hormonets struktur blev først opklaret i årene 1969 og 1970, nemlig næsten samtidig af to forskergrupper omkring henholdsvis R. Guillemin og A. Schally, se C.Y. Bowers et al. *Endocrinology* 86, 1143 (1970) og R. Burgus et al., *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 269, 1870 (1969).

Tripeptidet TRH blev oprindeligt beskrevet som en faktor der regulerer frigørelsen af TSH (det tyreotrope hormon) i hypofysen hos pattedyr; den forskning der beskæftigede sig med dette hormon blev imidlertid drejet i en ny retning da det erkendtes at dette tripeptids biologiske funktion ikke var begrænset til regulering af frigørelsen af det tyreotrope hormon, men også har en virkning på det centrale nervesystem, se N.P. Plotnikoff et al., *Science* 178, 417 (1972) og A.J. Prange et al., *Lancet* 2, 999 (1972). Det blev da fastslået at TRH foruden den nævnte hormonfunktion også nedsætter varigheden af den af barbiturater eller alkohol forårsagede søvn væsentligt og desuden nedsætter den af forskellige lægemidler bevirkeede hypotermi og øger den lokomotoriske aktivitet. En yderligere vigtig faktor blandt de virkninger der udøves på det centrale nervesystem af TRH er hæmning af katalepsi forårsaget af haloperidol. Det forekom herefter ønskværdigt til brug i terapeutisk praksis at fremstille TRH-analoger som kun virker svagt på hypofysen, men som derimod udviser virkninger på det centrale nervesystem som

står på højde med eller endog overstiger virkningen derpå af TRH. Til dette formål er der fremstillet en række sådanne forbindelser som er beskrevet i de tyske offentliggørelsesskrifter nr. 2 343 035, 2 343 037, 2 449 167, 2 514 381, 2 609 154 og 2 639 393 samt belgisk patentskrift nr. 819 198. Den forskning på disse områder, hvis resultater og erfaringer er sammenfattet af A.J. Pranne et al. ("The Role of Hormones in Depression", Life Sciences 20, 1305, 1977) og af A.V. Schally et al. ("Hypothalamic Regulatory Hormones", Ann. Rev. Biochem. 47, 89, 1978) har imidlertid ikke hidtil kunnet tilfredsstille de af den terapeutiske praksis stillede behov i alle henseender.

Som særligt eksempel på den kendte teknik skal nævnes at der fra tysk offentliggørelsesskrift nr. 26 39 393 kendes TRH-analoge hvor den midterste aminosyregruppe His er udskiftet med Ser eller Bz-Ser. Det fremgår af skriftet at disse forbindelser udmærker sig ved betydelig antidepressiv virkning, mens hormonvirkningen - dvs. TSH-virkning, der er en uønsket bivirkning - er nedsat i forhold til TRH. I forhold til de fra dette tyske skrift kendte forbindelser udmærker de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser sig ved at hormonvirkningen er elimineret eller praktisk taget elimineret, hvilket fremgår af omstående tabeller 1-3.

Fra dansk patentansøgning nr. 1195/77 kendes der forbindelser der måske kan anses for TRH-analoger. Disse kendte forbindelser differentierer ifølge skriftets tabel 1 i mindre grad mellem hormonvirkningen og CNS-virkningen end de ved den foreliggende opfindelse fremstillede forbindelser. Blandt virkningerne på det centrale nervesystem synes blot den dopaminpotentierende virkning at være betydelig.

Fra dansk patentansøgning nr. 4522/74 kendes derivater af TRH der er substitueret på aminogruppen i C-terminal stilling. Derved adskiller de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser sig fra de kendte

ved at TRHs aminosyresekvens er ændret. De fra DK 4522/74 kendte forbindelser har praktisk taget samme prolaktinudskillende og antidepressiv virkning som TRH og adskiller sig herved fra de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede.

Det skal endelig nævnes at der fra svensk patentskrift nr. 425 659, som svarer til bl.a. dansk patentansøgning nr. 994/75, kendes nogle tilsvarende TRH-analoge tripeptider, der dog også udviser væsentlige afvigelser fra de ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse fremstillede forbindelser. Således er i de kendte forbindelser N-terminalen Kic, Kpc eller Pca (om betydningen af disse forkortelser, i det omfang de ikke fremgår af IUPAC-reglerne, se senere i beskrivelsen), mens den midterste aminosyrerest er His som i TRH og C-terminalen er Pip, Pro eller Tca. Det menes at denne strukturforskel betinger den bedre virkning af de ved den foreliggende fremgangsmåde fremstillede forbindelser end af de kendte i henseende til undertrykkelse af hormonvirkningen. Disse forskelle er anskueliggjorte i omstående tabeller 1 og 2.

Det skal i øvrigt bemærkes at de i tabel 2 fra SE 425659 gengivne data vedrørende de derfra kendte forbindelser synes at bevise den fra faglitteraturen [Acta Pharm. Suec. 16, 95 (1979)] stammende urigtige oplysning, ifølge hvilken hormonvirkningen og CNS-virkningen af TRH-analoger ikke kan skille fra hinanden. De i tabel 2 og i tabel 3 gengivne data vedrørende de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser viser i modsætning hertil tydeligt den værdifulde og overraskende egenskab ved disse forbindelser, at man ved hensigtsmæssigt valg af aminosyreneheder kan fremstille TRH-analoger der i sammenligning med "grundmolekylet" har væsentlig stærkere virkning på nervesystemet, mens deres hormonvirkning er lav.

Det har nu vist sig at man ved udskiftning af histidylgruppen i 2-stilling i det af tre aminosyrer opbyggede TRH-molekyle kan opnå at tripeptidets hormonvirkning nedsættes væsentligt samtidig med at virkningen på det centrale nervesystem bibeholdes eller endog forhøjes betydeligt. Særlig fordelagtige har i disse

henseender sådanne TRH-analoger vist sig, som i 2-stillingen i stedet for L-histidylgruppen indeholder en alifatisk aminosyregruppe med lige eller grenet kulstofkæde. Sådanne TRH-analoger udviser ved næsten fuldstændigt fravær af hormonvirkningen en virkning på det centrale nervesystem som overstiger TRHs flere gange.

Til fremstilling af de omhandlede tripeptidamider med den almene formel I kan man ifølge opfindelsen hensigtsmæssigt gå frem som angivet i krav 2.

10 De på den foran beskrevne måde fremstillede tripeptidamider med den almene formel I kan isoleres fra reaktionsblandingen ved krystallisation eller lyofilisering; om ønsket kan de vundne produkter på sædvanlig måde omdannes til komplekser.

Ved den trinvis opbygning af tripeptidmolekylet omsættes udgangsforbindelsen med den almene formel Pro-NH-A, der fordelagtigt bruges i overskud, med et aktiveret derivat, fortrinsvis med pentafluorfenylesteren eller eventuelt med et blandet anhydrid af en et beskyttet L-aminosyre med den almene formel Boc-X-OH. Ved anvendelse af pentafluorfenylesteren vindes det 20 tilsvarende beskyttede dipeptidderivat med den almene formel Boc-X-Pro-NH-A på yderst kort reaktionstid, i løbet af nogle minutter, hvorved produktet let kan isoleres, i de fleste tilfælde i en form som ikke kræver yderligere rensning. Fra det på denne måde vundne beskyttede dipeptidderivat kan man derpå ved 25 acidolyse vinde de tilsvarende dipeptider, hvor endegruppen er fri og som har den almene formel H-X-Pro-A; dette dipeptid omsættes derefter med en pentafluorfenylester af den beskyttede L-pyroglutaminsyre med den almene formel Z-Glp-OPFP, hvorved man vinder det beskyttede tripeptid med den almene formel 30 Z-Glp-X-Pro-NH-A, hvorfra beskyttelsesgruppen Z med fordel kan fjernes ved katalytisk hydrogenering.

Rensning af det dannede slutprodukt kan ske ved simpel krystallisation eller omfældning, om nødvendigt eventuelt også ved søjlekromatografi. I nogle tilfælde kan slutproduktet 35 udpræpareres ved simpel lyofilisering efter fjernelse af biprodukter.

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede tripeptidderivater med den almene formel I er afprøvet for farmakologiske virkninger ved de i det følgende beskrevne biologiske metoder.

- 5 1) Hæmning af haloperidol-katalepsi hos rotter (se J. Delay og P. Deniker: Compt. Rend. Cong. Med. Alenistes Neurologistes, 19, 497, Luxemburg 1952)

40 mg/kg haloperidol, dvs. 4-(p-klorfenyl)-1-[3-(p-fluorbenzoyl)-propyl]-piperidin-4-ol blev indgivet subkutant
10 til dyrene og efter 120 minutter blev katalepsiens indtræden kontrolleret; derefter inddeltes rotterne i grupper på hver 10 dyr og de behandledes med intravenøst indgivne doser af TRH eller af de til afprøvning værende TRH-analoge tripeptider. Kontrolgruppernes dyr behandledes med fysiologisk kogsaltopløsning.
15 15, 30, 90 og 120 Minutter efter behandlingen undersøges de enkelte forbindelsers katalepsiophævede virkning. De dyr blev anset for kataleptiske, som efter at være blevet anbragt med forfødderne på en 7 cm høj søjle ikke har korri-
geret deres position i løbet af 30 sekunder.

- 20 Ud fra antallet af dyr der ikke udviste katalepsi fandt man ved probit-analyse frem til ED₅₀-værdierne for de enkelte virksomme stoffer.

Disse forsøg gennemførtes med hanrotter af stammen Wistar og med en vægt på hver 160 til 180 g.

- 25 2) Potentiering af den af L-Dopa forårsagede lokomotoriske aktivitet hos mus (se The Thyroid Axis, Drugs and Behavior, side 116, af A. J. Prage Jr., Raven Press, New York 1974).

Dyrene fik først interperitonealt indgivet 40 mg/kg
30 N-metyl-N-propargylbenzylamin (pargyline) og derefter på samme måde 20 mg/kg enten TRH eller det til undersøgelse værende tripeptid, og til slut ligeledes intraperitonealt 100 mg/kg L-dopa. 30, 60 og 90 Minutter efter denne behandling målt
dyrenes lokomotoriske aktivitet; de fundne værdier er i om-
35 stående tabel angivet i procent af de værdier der opnåedes hos de med TRH behandlede dyr. Til hvert af disse forsøg brugtes der 15 hanmus med en vægt på hver 18 til 22 g.

3) Reserpin-hypotermi-reverserende virkning hos mus (se B.M. Askew, Life Sci., 2, 725-730, 1963).

Der anvendtes hanmus med en vægt på hver 18 til 22 g og inddelt i grupper på hver 10 dyr. Hvert dyr fik intraperitonealt indgivet 5 mg/kg reserpin, og efter 16 timer behandles dyrene med doser på 20 mg/kg TRH eller det til undersøgelse værende tripeptid.

Dyrenes rektale temperatur målttes før behandlingen med reserpin (i omstående tabel betegnet "norm.") og 16 timer efter behandlingen med reserpin (i tabellen betegnet "res.") og yderligere 1 eller 2 timer efter indgiften af det til undersøgelse værende tripeptid (i tabellen betegnet "efter behandl."). I tabellen er der angivet gennemsnitsværdier for rektaltemperaturerne hos de 10 mus i gruppen.

15 4) Påvirkning af varigheden af den af hexobarbitalfremkaldte søvn.

Der anvendtes hanmus inddelt i grupper på hver 10 mus, og hver mus fik intravenøst indgivet 60 mg/kg hexobarbitalnatrium (natrium-enhexymal; natriumsaltet af 5-(1-cyklohexen-20 1-yl)-1,5-dimetylbarbitursyre). Efter 10 minutter blev dyrene behandlet intraperitonealt med en dosis på 20 mg/kg TRH eller det til undersøgelse værende tripeptid. Søvn-tiderne angives i omstående tabel i værdier der udtrykkes i procent af søvntiden for dyrene i kontrolgruppen (idet der er tale om gennemsnitsværdier for 10 dyr).

5) Ætanolnarkose (se J. M. Cott et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 594, 1976).

Der anvendtes grupper på 20 mus af begge køn, hver med en vægt på 18 til 22 g. Til hvert dyr blev der intraperitonealt indgivet 4,5 g ^{pr. kg legemsvægt} ætanol/og efter 10 minutter behandledes derpå dyrene intraperitonealt med doser på 20 mg/kg af det til undersøgelse værende tripeptid. Søvn-tiderne er i omstående tabel angivet i procent af søvntiden for dyrene i kontrolgruppen (gennemsnitsværdier for 20 dyr).

35 6) Hormonaktivitet (TSH-virkning) hos rotter.

Wistar-hanrotter med hver en vægt på ca. 200 g inddeltes i grupper på 7 til 8 dyr og behandledes intravenøst med en dosis på 20 mg/kg TRH eller det til undersøgelse værende

tripeptid. Dyrenes TSH-reaktion blev fastslået 15 minutter efter behandlingen med TRH eller med den TRH-analoge forbindelse, idet dyrets/^{plasma}underkastedes radioimmun-undersøgelse. De relative virkningsgrader blev beregnet ved firpunktsmetoden
5 ved hjælp af en TPA 101-computer, hvorved virkningshøjden af TRH arbitrært sættes til 100.

De på de foran beskrevne farmakologiske måder fundne data for de biologiske virkninger er sammenfattet i nedenstående tabel 1 for en del af de omhandlede forbindelser med den
10 almene formel I.

Tabel 1

GlP-X-Pro-NH-A X	Hæmning af haloperidol- katalapsi ED ₅₀ mg/kg min.	Potentiering af L-Dopa-lokomoto- risk aktivitet, % efter min.	Reversering af reserpin- hypotermi rektaltemperatur, °C efter behandl.	Hexobarbital- søvn- tid % af kontrol- dyrene	Hexobarbital- søvn- tid % af kontrol- dyrene	TSH- virkning
		30 60 90	norm. res. lt. 2t.			
Nva	11,4 120	254 156 214	36,2 25,9 36,4 32,0	114	77	0
Nleu	16,8 120	249 105 112	36,3 27,1 37,6 32,2	77	74	3,8
Abu	80 15	27 14 18	36,3 19,7 22,2 25,4	84	39	0,02
TRH	80 15	100 100 100	36,2 25,9 35,5 30,2	56	35	100,0

8

Hexobarbital-søvn-
tid: $(\bar{X} \pm SE)$ 38,4 $\pm$ 1,36 min.
Hexobarbital-søvn-
tid: $(\bar{X} \pm SE)$ 46,9 $\pm$ 2,17 min.

149611

Af de i foranstående viste data ses det at man ved udskiftning af His med en alifatisk aminosyre med lige eller grenet kulstofkæde i TRH-molekylet opnår ophør eller i det mindste væsentlig nedsættelse af udskillelsen af TSH, hvorved
 5 fx hæmningen af den af haloperidol bevirkede katalepsi bliver 2 til 7 gange stærkere. Nogle nye TRH-analoger udviser også væsentlig potentiering af den lokomotoriske aktivitet eller nedsættelse af hexobarbital- eller ætanol-søvntiden.

Som nævnt foran er der foretaget sammenligningsforsøg
 10 med forbindelser kendt fra SE 425659. De fremgår af nedenstående tabel 2, der er omtalt foran. I tabel 3 er CNS-virkningerne nærmere specificeret på fire af de virkningskategorier der er nærmere belyst foran, og for hvis vedkommende forsøgsteknikken ligeledes er beskrevet foran. I både tabel 2
 15 og 3 er virkningen af TRH arbitrært ansat til værdien 1.

Tabel 2

Stof	Hormonvirkning	CNS-virkning
Naturligt TRH	1	1
<u>Kendt fra SE 425 659</u>		
20 Kpc-His-Tca-NH ₂	1	8
Kpc-His-Pro-NH ₂	1	4
DL-Kpc-His-Pro-NH ₂	0,2	3
Kic-His-Pro-NH ₂	0,1	1
Kic-His-Pro-OCH ₃	0,001	0
<u>25 Fremstillet ifølge opfindelsen</u>		
Glp-Nva-Pro-NH ₂	0	7
Glp-Nle-Pro-NH ₂	0,038	5
Glp-Abu-Pro-NH ₂	0	1

Tabel 3

Stof	Hormonvirkning	CNS-virkning			
		A	B	C	D
TRH	1	1	1	1	1
5 Fremstillet ifølge opfindelsen -----					
Glp-Nva-Pro-NH ₂	0	7	2,5	svag	0,35
Glp-Nle-Pro-NH ₂	0,038	5	2,5	0,5	0,4

A = Hæmning af haloperidol-katalepsi

10 B = Potentiering af den lokomotoriske aktivitet af DOPA

C = Antagonisering af hexobarbitalnarkose

D = Antagonisering af ætanolnarkose

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede tripeptider såvel som deres farmaceutisk acceptable salte eller komplekser kan anvendes i terapien i form af sædvanlige lægemiddelpræparater. Disse lægemiddelpræparater indeholder et af de omhandlede virksomme stoffer sammen med uorganiske eller organiske bærestoffer som egner sig til enteral eller parenteral indgift. Lægemiddelpræparaterne kan fx fremstilles i form af 15 faste lyofilisater, sammen med hvilke der kan bruges bærestoffer, fx kulhydrater, der ikke reagerer med peptiderne; de kan imidlertid også foreligge i form af koncentrerede eller fortyndede suspensioner eller emulsioner eller tabletter eller injektionspræparater.

25 Den praktiske udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved de efterfølgende eksempler. De i disse eksempler anvendte forkortelser svarer til de i peptidkemien sædvanligt anvendte, se J. Biol. Chem. 247, 977 (1972). Herudover er der anvendt følgende forkortelser:

30 Ada L-2-aminodekansyre
 Abu L-2-aminosmørsyre
 Cha L-cyklohexylalanin
 DAE 2-dimetylaminoætyl
 DCC dicyklohexylkarbodiimid
 35 PFPOH pentafluorfenol
 DCU dicyklohexylurinstof
 DMFA dimetylformamid

De i eksemplerne angivne smeltepunkter for forbindelserne bestemtes med et smeltepunkt-måleapparat efter Dr. Tottoli (Büchi). De optiske rotationer målttes ved hjælp af et polarimeter af typen Perkin-Elmer 141. I de tyndlagskromatografiske undersøgelser eller adskillelser anvendtes der silika-

5 plader af "Kieselgel G efter Stahl" fra E. Merck i Darmstadt. Til fremkaldelse af kromatogrammerne anvendtes følgende opløsningsmiddelblandinger:

- (1) kloroform/metanol 9:1
- 10 (2) ætylacetat/(pyridin/eddikesyre/vand 20:6:11) 9:1
- (3) ætylacetat/(pyridin/eddikesyre/vand 20:6:11) 8:2
- (4) ætylacetat/(pyridin/eddikesyre/vand 20:6:11) 3:2

Til fremkaldelse af pletterne anvendtes en ninhydrinopløsning; efter sprøjtningen tørredes pladerne ca. 5 minutter ved 105°C. Derefter anbragtes kromatogrammet i klorgas og efter luftning med o-tolidin-kaliumjodidopløsning fremkaldtes der.

15

Til søjlekromatografisk rensning af produkterne anvendtes "Kieselgel G" fra E. Merck, nemlig silikagel med patikelstørrelsen 0,062 til 0,2 mm.

20

Til inddampning af opløsningen i vakuum anvendtes der en "Rotavapor R" (Büchi) vakuum-evaporator og inddampningen gennemførtes ved temperaturer der ikke overskred 50°C.

Pentafluorfenylestrene af BOC-beskyttede aminosyrer fremstilledes efter den af Kisfaludy et al. (Ann. 1973, 1421) angivne metode.

25

De nærmere enkeltheder ved fremstillingen af TRH-analogerne fremgår af efterfølgende eksempler.

Eksempel 1

30 L-Pyroglutamyl-L-norleucyl-L-prolinamid

Trin 1: L-norleucyl-L-prolinamid-hydroklorid

2,28 g (20 mmol) H-Pro-NH₂ og 3,97 g (10 mmol) BOC-Nle-OPFP (se Kisfaludy et al, Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chemie 359, 887, 1978) opløses i 40 ml DMFA og efter 5 minutters hen-

35 ståen inddampes opløsningen i vakuum. Den som remanens vundne olie opløses i 50 ml kloroform og opløsningen udrystes med 3 x 10 ml

N saltsyreopløsning, 3 x 10 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og til sidst 10 ml vand, tørres med vandfrit natriumsulfat og indampes. Fordampningsremanensen opløses i 5 ml ætylacetat og til opløsningen sættes der 10 ml 5N saltsyreopløsning i ætylacetat. Efter 30 minutter fortyndes reaktionsblandingen med æter og det dannede bundfald frafiltreres og tørres i vakuum over vandfrit natriumhydroxyd. Der vindes på denne måde 2,48 g H-Nle-Pro-NH₂,HCl svarende til 94% af det teoretiske udbytte beregnet på BOC-Nle-OPFP. $R_f(4) = 0,20$.

10 Trin 2: Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-norleucyl-L-prolinamid

1,05 g (4 mmol) H-Nle-Pro-NH₂,HCl opløses i 10 ml DMFA og til opløsningen sættes under isafkøling og omrøring 0,56 ml (4 mmol) triætylamin og 1,89 g (4,4 mmol) Z-Glp-OPFP. Efter 5 minutters omrøring tilsættes yderligere 0,56 ml (4 mmol) triætylamin; blandingen omrøres i 20 minutter og derefter indampes den i vakuum til tørhed. Fordampningsremanensen opløses i 40 ml kloroform og opløsningen udrystes med 2 x 10 ml N saltsyre, 3 x 10 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og til sidst 10 ml vand, tørres derpå med vandfrit natriumsulfat og indampes i vakuum. Den som remanens vundne olie bringes til krystallisation under æter og det på denne måde vundne råprodukt (1,52 g) omkrystalliseres fra 8 ml ætylacetat. Der vindes 1,36 g (72%) Z-Glp-Nle-Pro-NH₂ med smp. 146-148°C. $R_f(3) = 0,32$. $[\alpha]_D^{25} = -79,8^\circ$ (c = 1 i eddikesyre). Beregnet for C₂₄H₃₂O₆N₄ (472,55): C 61,00 H 6,83 N 11,86 Fundet: C 60,90 H 7,04 N 11,87%.

Trin 3: L-pyroglutamyl-L-norleucyl-L-prolinamid

1,16 g (2,46 mmol) Z-Glp-Nle-Pro-NH₂ opløses i 25 ml metanol, der sættes 0,2 g katalysator af 10% palladium på aktive kul til opløsningen og der ledes i 30 minutter hydrogen gas igennem den. Katalysatoren frafiltreres derefter og filtratet indampes. Den faste, amorfe remanens rives med æter og frafiltreres. Det på denne måde vundne råprodukt (0,72 g) opløses i vand, opløsningen klares med aktivt kul og den vandklare opløsning frysetørres. Der vindes 0,66 g (79,5%)

Glp-Nle-Pro-NH₂. $R_f(4) = 0,43$. $[\alpha]_D^{25} = -77,1^\circ$ ($c = 1$ i eddikesyre).

Aminosyreanalyse: Glu 0,96 (1,0), Nle 1,00 (1,0), Pro 1,00 (1,0).

5 Eksempel 2

L-Pyroglutamyl-L-norvalyl-L-prolinamid

Trin 1: L-Norvalyl-L-prolinamid-hydroklorid

2,2 g (20 mmol) H-Pro-NH₂ og 3,83 g (10 mmol) BOC-Nva-OPFP (se L. Kisfaludy et al, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 395, 887, 1978) opløses i 40 ml DMFA og opløsningen henstår i 5 minutter og indampes derefter i vakuum. Den som remanens vundne olie opløses i 50 ml kloroform og opløsningen udrystes med 3 x 10 ml N saltsyre, 3 x 10 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og til sidst 10 ml vand, tørres over vandfrit natriumsulfat og indampes. Fordampningsremanensen opløses i 5 ml ætylacetat og der tilsættes 10 ml 5N saltsyreopløsning i ætylacetat. Efter 30 minutter fortyndes reaktionsblandingen med æter og det dannede bundfald frafiltreres og tørres i vakuum over vandfrit natriumhydroxyd. På denne måde vindes der 1,83 g H-Nva-Pro-NH₂,HCl, svarende til 73% af det på BOC-Nva-OPFP beregnede teoretiske udbytte. $R_f(4) = 0,10$.

Trin 2: Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-norvalyl-L-prolinamid

1,25 g (5 mmol) H-Nva-Pro-NH₂,HCl opslættes i 15 ml DMFA og under isafkøling og omrøring tilsættes der 0,7 ml (5 mmol) triætylamin og 2,15 g (5 mmol) Z-Glp-OPFP. Efter 5 minutter tilsættes der yderligere 0,7 ml (5 mmol) triætylamin, blandingen omrøres i yderligere 20 minutter og indampes derefter i vakuum. Fordampningsremanensen opløses i 50 ml kloroform og opløsningen udrystes med 3 x 10 ml N saltsyre, 3 x 10 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og til sidst 10 ml vand, tørres med vandfrit natriumsulfat og indampes. Den som remanens vundne olie bringes til krystallisation under æter og det på denne måde vundne råprodukt (1,80 g) omkrystalliseres fra en blanding af ætanol og æter. Der vindes 1,66 g (72%) Z-Glp-Nva-Pro-NH₂ med smp. 166-167°C ($R_f(3) = 0,29$. $[\alpha]_D^{25} = -87,5^\circ$ ($c =$

l i eddikesyre).

Beregnet for $C_{23}H_{30}O_6N_4$ (458,52): C 60,25 H 6,59 N 12,22

Fundet: C 60,08 H 6,70 N 12,15%.

Trin 3: L-Pyroglutamyl-L-norvalyl-L-prolinamid

- 5 1,42 g (3,1 mmol) Z-Glp-Nva-Pro-NH₂ opløses i 30 ml metanol, der sættes 0,2 g 10% palladium-på-kul-katalysator til opløsningen og der ledes hydrogen gas igennem den i 30 minutter. Derefter frafiltreres katalysatoren og filtratet indampes. Den faste, amorf reanens rives med æter og fraskilles.
- 10 Det på denne måde vundne råprodukt opløses i vand. Opløsningen klares med aktive kul og den vandklare opløsning frysetørres. Der vindes 0,95 g (94%) Glp-Nva-Pro-NH₂. $R_f(4) = 0,36$. $[\alpha]_D^{25} = -87,0^\circ$ (c = 1 i eddikesyre).
- Aminosyreanalyse: Glu 0,97 (1,0), Nva 1,09 (1,0), Pro
- 15 1,00 (1,0).

Eksempel 3

L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-prolinamid

Trin 1: L-Prolyl-L-prolinamid-hydroklorid

- 2,28 g (20 mmol) H-Pro-NH₂ og 3,81 g (10 mmol) BOC-Pro-OPFP opløses i 40 ml DMFA og opløsningen udrystes med 3 x 10 ml N saltsyre, 3 x 10 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og 10 ml vand, tørres med vandfrit natriumsulfat og indampes.
- 20 Fordampningsreanensen opløses i 5 ml ætylacetat og der tilsættes 10 ml 5N saltsyreopløsning i ætylacetat. Efter 30 minutter
- 25 fortyndes reaktionsblandingen med æter og det dannede bundfald frafiltreres og tørres i vakuum over vandfrit natriumhydroxyd. Der vindes på denne måde 2,06 g H-Pro-Pro-NH₂·HCl (83% af det på BOC-Pro-OPFP beregnede teoretiske udbytte). $R_f(4) = 0,05$.

Trin 2: Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-prolinamid

- 30 0,75 g (3 mmol) H-Pro-Pro-NH₂·HCl opslættes i 10 ml DMFA og under isafkøling og omrøring tilsættes der 0,42 ml (3 mmol) triætylamin og 1,35 g (3,15 mmol) Z-Glp-OPFP. Efter 5 minutter tilsættes der yderligere 0,42 ml (3 mmol) triætylamin og efter yderligere 10 minutters omrøring indampes den dannede tykke

suspension i vakuum. Den krystallinske fordampningsremanens rives med 8 ml ætanol og henstår 3 timer i køleskab. Det dannede bundfald filtreres derefter og tørres. Der vindes på denne måde 1,0 g (73%) Z-Glp-Pro-Pro-NH₂ med smp. 247-248°C (sønderdeling). $R_f(3) = 0,19$. $[\alpha]_D^{25} = -82,8^\circ$ (c = 1 i eddikesyre).
 5 Beregnet for C₂₃H₂₈O₆N₄ (456,50): C 60,52 H 6,18 N 12,27
 Fundet: C 60,03 H 6,20 N 12,20%.

Trin 3: L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-prolinamid

1,0 g (2,2 mmol) Z-Glp-Pro-Pro-NH₂ opløses i 50 ml eddikesyre, der tilsættes 0,2 g 10% palladium-på-kul-katalysator og der ledes hydrogengas gennem blandingen i 1 time. Katalysatoren frafiltreres derefter og filtratet inddampes hvorefter remanensen rives med æter. Det på denne måde vundne amorfe råprodukt (0,60 g) opløses i vand, opløsningen klares med aktive kul og den vandklare opløsning frysetørres. Der vindes herved
 15 0,50 g (70%) Glp-Pro-Pro-NH₂. $R_f(4) = 0,10$. $[\alpha]_D^{25} = -223,1^\circ$ (c = 1 i eddikesyre).

Eksempel 4

L-Pyroglutamyl-L-valyl-L-prolinamid

20 Trin 1: L-Valyl-L-prolinamid-hydroklorid

0,49 g (4,2 mmol) H-Pro-NH₂ og 0,82 g (2,14 mmol) BOC-Val-OPFP opløses i 10 ml DMFA og efter 30 minutters henstand inddampes opløsningen i vakuum. Den som fordampningsremanens vundne olie opløses i 10 ml kloroform og opløsningen udrystes
 25 med 2 x 3 ml N saltsyre, 3 x 3 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og til sidst 3 ml vand, hvorpå den tørres ved hjælp af vandfrit natriumsulfat og inddampes. Fordampningsremanensen opløses i 3 ml ætylacetat og der tilsættes 3 ml 5N saltsyreopløsning i ætylacetat. Efter 1 times henstand fortyndes reaktionsblandingen med æter, bundfaldet frafiltreres og det tørres i vakuum
 30 over vandfrit natriumhydroxyd. Der vindes på denne måde 0,51 g H-Val-Pro-NH₂, HCl (95% af det på BOC-Val-OPFP beregnede teoretiske udbytte). $R_f(4) = 0,10$.

Trin 2: Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-valyl-L-prolinamid

0,38 g (1,52 mmol) H-Val-Pro-NH₂·HCl opslættes i 10 ml DMFA og under isafkøling og omrøring tilsættes der 0,22 ml (1,52 mmol) triætylamin og 0,69 g (1,6 mmol) Z-Glp-OPFP. Efter 5 10 minutter tilsættes der yderligere 0,22 ml (1,52 mmol) triætylamin og efter yderligere 30 minutters omrøring indampes reaktionsblandingen i vakuum. Fordampningsremanensen opløses i 15 ml kloroform og opløsningen udrystes med 2 x 5 ml N salt- 10 syre, 3 x 5 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og 5 ml vand, tørres ved hjælp af vandfrit natriumsulfat og indampes i vakuum. Den olieagtige remanens bringes til krystallisation med æter; der vindes på denne måde 0,54 g (77%) Z-Glp-Val-Pro-NH₂ med smp. 116-118°C. R_f(3) = 0,30. [α]_D²⁵ = -100,5° (c = 1 i eddikesyre).

15 Trin 3: L-Pyroglutamyl-L-valyl-L-prolinamid

9,65 g (21,2 mmol) Z-Glp-Val-Pro-NH₂ opløses i 300 ml vand og efter tilsætning af 2 g 10% palladium-på-aktive-kul-katalysator ledes der hydrogen gas gennem opløsningen i 5 timer. Katalysatoren frafiltreres derefter og filtratet indampes. 20 Den som remanens vundne olie opløses i ætanol, opløsningen indampes og denne operation gentages yderligere to gange. Den til sidst vundne amorfe, faste remanens rives med æter; der vindes på denne måde 4,47 g (65%) Glp-Val-Pro-NH₂. R_f(4) = 0,34. [α]_D²⁵ = -104,9° (c = 1 i eddikesyre). 25 Aminosyreanalyse: Glu 1,03 (1,01), Val 1,00 (1,0), Pro 0,94 (1,0).

Eksempel 5

L-Pyroglutamyl-L-isoleucyl-L-prolinamid

Trin 1: Benzyloxykarbonyl-L-isoleucyl-L-prolinamid

30 51,4 g (0,1 mol) Z-Ile-OPFP og 12,5 g (0,11 mol) H-Pro-NH₂ opløses i 250 ml DMFA og til opløsningen sættes 14,0 ml (0,1 mol) triætylamin. Reaktionsblandingen henstår natten over og indampes næste dag i vakuum. Den som remanens vundne olie opløses i 500 ml kloroform og opløsningen udrystes successivt 35 med 2 x 100 ml N saltsyre, 2 x 100 ml N natriumhydrogenkarbo-

natopløsning og 1 x 100 ml vand, tørres ved hjælp af vandfrit natriumsulfat og inddampes. Den olieagtige remanens bringes til krystallisation med en blanding af 100 ml æter og 100 ml n-hexan. Det på denne måde vundne råprodukt (31,7 g) omkrystalliseres fra en blanding af 60 ml ætylacetat og 60 ml n-hexan. Der vindes 30,32 g (84%) Z-Ile-Pro-NH₂ med smp. 127-128°C. R_f(2) = 0,54.

Trin 2: L-Isoleucyl-L-prolinamid-hydroklorid

24,0 g (66,5 mmol) Z-Ile-Pro-NH₂ opløses i 470 ml metanol, der tilsættes 30 ml 2,4N metanolisk saltsyreopløsning og 4 g 10% palladium-på-aktiv-kul-katalysator og der ledes hydrogengas gennem blandingen i 1 time. Derefter frafiltreres katalysatoren og filtratet inddampes. Fordampningsremanensen rives med æter og det på denne måde vundne råprodukt (20 g) omkrystalliseres fra en blanding af metanol og æter. Der vindes 16,05 g (81%) H-Ile-Pro-NH₂·HCl med smp. 135-140°C. R_f(4) = 0,15.

Trin 3: Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-isoleucyl-L-prolinamid

0,90 g (3,5 mmol) H-Ile-Pro-NH₂·HCl opslættes i 20 ml DMFA og der tilsættes under isafkøling og omrøring 0,49 ml (3,5 mmol) triætylamin og 1,57 g (3,7 mmol) Z-Glp-OPFP. Efter 5 minutter tilsættes der yderligere 0,49 ml (3,5 mmol) triætylamin og efter yderligere 20 minutters omrøring inddampes reaktionsblandingen i vakuum. Fordampningsremanensen opløses i 30 ml kloroform og opløsningen udrystes successivt med 3 x 7 ml N saltsyre, 3 x 7 ml N natriumhydrogenkarbonat og 1 x 7 ml vand, hvorpå den tørres med vandfrit natriumsulfat og inddampes. Den som remanens vundne olie behandles flere gange med æter og æteren dekanteres; til sidst bringes råproduktet til krystallisation under æter, fraskilles, opløses i ætylacetat og udfældes på ny ved tilsætning af æter. Der vindes på denne måde 1,18 g (71,5%) Z-Glp-Ile-Pro-NH₂ med smp. 87-89°C. R_f(3) = 0,36. $[\alpha]_D^{25} = -91,4^\circ$ (c = 1 i eddikesyre). Beregnet for C₂₄H₃₂O₆N₄ (427,55): C 61,00 H 6,83 N 11,6
Fundet: C 59,19 H 6,88 N 11,16%.

Trin 4: L-Pyroglutamyl-L-isoleucyl-L-prolinamid

4,72 g (10 mmol) Z-Glp-Ile-Pro-NH₂ opløses i 100 ml metanol, der tilsættes 1 g 10% palladium-på-aktivt-kul-katalysator og der føres hydrogen gas gennem blandingen i 1 time. Derefter frafiltreres katalysatoren, filtratet indampes og re-

5 manensen rives med æter. Det på denne måde vundne råprodukt (3,22 g) opløses i vand og opløsningen klares med aktivt kul. Den vandklare opløsning frysetørres og der vindes 3,03 g (98%) Glp-Ile-Pro-NH₂. $R_F(4) = 0,45$. $[\alpha]_D^{25} = -100,7^\circ$ ($c = 1$ i eddikesyre).

10

Aminosyreanalyse: Glu 0,95 (1,0), Ile 1,00 (1,0), Pro 1,02 (1,0).

Eksempel 6L-Pyroglutamyl-L- α -aminobutyryl-L-prolinamid

15 Trin 1: t-Butyloxykarbonyl-L- α -aminosmørsyre-pentafluorfenylester

7,7 g (20 mmol) BOC-Abu-OH, DCHA opslættes i 60 ml æter, der tilsættes 20 ml 2N svovlsyre og rystes indtil der er indtrådt opløsning af den suspenderede substans. Derefter fraskilles æterfasen, udrystes med 20 ml 2N svovlsyre og derefter

20 20 ml vand, tørres med vandfrit natriumsulfat og indampes. Den som remanens vundne olie (4,14 g) og 3,7 g (20 mmol) PFPOH opløses i 25 ml ætylacetat, opløsningen afkøles til under 5°C og der tilsættes 3,92 g (19 mmol) ^{DCC} under omrøring. Reaktions-

25 blandingen omrøres i 1 time i isbad og derefter frafiltreres DCU og filtratet indampes. Den som remanens vundne olie opløses i n-hexan og opløsningen henstår i 1 time i køleskab. Det herefter yderligere udskilte DCU frafiltreres og filtratet indampes til et rumfang på 20 ml. Efter begyndelsen af krystal-

30 udskillelsen anbringes suspensionen i køleskab og henstår der natten over; næste dag fraskilles krystallerne ved filtrering. Der vindes på denne måde 5,57 g (76%) BOC-Abu-OPFP med smp. 83-84°C. $R_F(1) = 0,86$. $[\alpha]_D^{25} = -32,8^\circ$ ($c = 1$ i ætylacetat). Beregnet for C₁₅H₁₆O₄NF₅ (369,29): C 48,79 H 4,37 N 3,79 F 25,72

35 Fundet: C 48,55 H 4,28 N 3,70 F 25,44%.

Trin 2: L- α -Aminobutyryl-L-prolinamid-hydroklorid

3,2 g (28 mmol) H-Pro-NH₂ og 5,16 g (14 mmol) BOC-Abu-OPFP opløses i 60 ml DMFA og efter 5 minutters henståen ind-
dampes opløsningen i vakuum. Den som remanens vundne olie op-
løses i 100 ml kloroform og opløsningen udrystes med 2 x 20 ml
N saltsyre og med 2 x 20 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning,
tørres med vandfrit natriumsulfat og inddampes. Den som rema-
nens vundne olie opløses i 20 ml ætylacetat og der tilsættes
20 ml 6N saltsyreopløsning i ætylacetat. Efter 1 time fortyn-
des reaktionsblandingen med æter og det dannede bundfald fra-
filtreres og tørres i vakuum over vandfrit natriumhydroxyd.
Det på denne måde vundne råprodukt (3,86 g) rives med 20 ml
kold DMFA. Der vindes 2,40 g H-Abu-Pro-NH₂,HCl svarende til
73% af det på BOC-Abu-OPFP beregnede teoretiske udbytte. $R_f(4) =$
0,10.

Trin 3: Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L- α -aminobutyryl-L-prolinamid

2,13 g (9 mmol) H-Abu-Pro-NH₂,HCl opslættes i 30 ml
DMFA og under isafkøling og omrøring tilsættes der 1,26 ml
(9 mmol) triætylamin og 3,95 g (9,2 mmol) Z-Glp-OPFP. Efter
5 minutter tilsættes der yderligere 1,26 ml (9 mmol) triætyl-
amin og efter 20 minutters yderligere omrøring inddampes reak-
tionsblandingen i vakuum. Den krystallinske remanens rives med
20 ml ætanol, henstår natten over i køleskab og frafiltreres
derefter. På denne måde vindes der 3,30 g (82%) Z-Glp-Abu-Pro-
NH₂ med smp. 175-176°C. $R_f(3) = 0,28$. $[\alpha]_D^{25} = -99,6^\circ$ (c = 1 i
eddikesyre).

Trin 4: L-Pyroglutamyl-L- α -aminobutyryl-L-prolinamid

2,67 g (6 mmol) Z-Glp-Abu-Pro-NH₂ opløses i 100 ml eddi-
kesyre, til opløsningen sættes der 0,5 g 10% palladium-på-kul-
katalysator og derefter ledes der hydrogen gas gennem blandin-
gen i 1 time. Efter frafiltrering af katalysatoren inddampes
filtratet og remanensen rives med æter. Det på denne måde vund-
ne amorfe råprodukt (1,82 g) opløses i vand og opløsningen kla-
res med aktive kul hvorpå den vandklare opløsning frysetørres.
Der vindes 1,70 g (91%) Glp-Abu-Pro-NH₂. $R_f(4) = 0,24$. $[\alpha]_D^{25} =$

-102,5° (c = 1 i eddikesyre).

Eksempel 7

L-Pyroglutamyl-L-α-aminodekanoyl-L-prolinamid

Trin 1: L-α-Aminodekanoyl-L-prolinamid-hydroklorid

- 5 1,37 g (12 mmol) H-Pro-NH₂ og 2,72 g (6 mmol) BOC-Ada-OPFP opløses i 20 ml DMFA og efter 5 minutters henstand ind-
- dampes opløsningen i vakuum. Den som remanens vundne olie op-
- løses i 50 ml kloroform og opløsningen udrystes med 3 x 10 ml
- 10 N saltsyre, 3 x 20 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og
- til sidst 2 x 10 ml vand, tørres med vandfrit natriumsulfat
- og indampes. Den som remanens vundne olie opløses i 3 ml ætyl-
- acetat og til opløsningen sættes 5 ml 6N saltsyreopløsning.
- Efter 1 times henstand fortyndes reaktionsblandingen med æter
- og det dannede bundfald frafiltreres og tørres i vakuum over
- 15 vandfrit natriumhydroxyd. Der vindes på denne måde 1,75 g
- H-Ada-Pro-NH₂,HCl, svarende til 91% af det på BOC-Ada-OPFP be-
- regnede teoretiske udbytte. R_f(3) = 0,11.

Trin 2: Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-α-aminodekanoyl-L-prolinamid

- 20 1,75 g (5,5 mmol) H-Ada-Pro-NH₂,HCl og 2,58 g (6 mmol)
- Z-Glp-OPFP opløses i 30 ml DMFA og til opløsningen sættes der
- 0,77 ml (5,5 mmol) triætylamin. Efter 5 minutter tilsættes der
- yderligere 0,77 g (5,5 mmol) triætylamin og efter 20 minutters
- yderligere omrøring indampes reaktionsblandingen i vakuum.
- 25 Fordampningsremanensen opløses i 50 ml kloroform og opløsning-
- gen udrystes med 3 x 20 ml N saltsyre, 3 x 20 ml N natriumhy-
- drogenkarbonatopløsning og til sidst 2 x 20 ml vand, tørres med
- vandfrit natriumsulfat og indampes.

- Den som remanens vundne opskummende olie rives med æter,
- 30 den dannede gelagtige suspension henstår i ca. 2 timer i køle-
- skab og derefter frafiltreres bundfaldet og tørres. Det på den-
- ne måde vundne råprodukt (2,61 g) omkrystalliseres fra 20 ml
- ætylacetat. Der vindes 2,45 g (84%) Z-Glp-Ada-Pro-NH₂ med smp.
- 103-105°C. R_f(2) = 0,19. [α]_D²⁵ = -63,7° (c = 1 i eddikesyre).

Beregnet for $C_{28}H_{40}O_6N_4$ (528,65): C 63,62 H 7,63 N 10,60

Fundet: C 63,24 H 7,81 N 10,57%.

Trin 3: L-Pyroglutamyl-L- α -aminodekanoyl-L-prolinamid

1,9 g (3,6 mmol) Z-Glp-Ada-Pro-NH₂ opløses i 40 ml eddikesyre og til opløsningen sættes der 0,2 g 10% palladium-på-kul-katalysator hvorpå der i 1 1/2 time ledes hydrogengas gennem blandingen. Katalysatoren frafiltreres derefter, filtratet indampes og fordampningsremanensen opløses i vand. Den vandige opløsning klares med aktivt kul og indampes. Den som remanens vundne olie opløses i 30 ml kloroform og opløsningen tørres med vandfrit natriumsulfat og indampes. Den opskummende, amorfe faste remanens rives med æter, frafiltreres og tørres. Der vindes på denne måde 1,20 g (82%) Glp-Ada-Pro-NH₂. $R_f(4) = 0,55$. $[\alpha]_D^{25} = -66,2^\circ$ (c = 1 i eddikesyre).

Eksempel 8

L-Pyroglutamyl-L-cyklohexylalanyl-L-prolinamid

Trin 1: t-Butyloxykarbonyl-L-cyklohexylalanin-pentafluorfenylester

9,04 g (20 mmol) BOC-Cha-OH, DCHA opslæmmes i 80 ml æter og til suspensionen sættes der 20 ml 2N svovlsyre. Blandingen rystes til opløsning af den faste substans og derefter fraskilles æterfasen og vaskes med 20 ml 2N svovlsyre og derefter 20 ml vand, hvorpå den tørres med natriumsulfat og indampes. Den som remanens vundne olie (5,7 g) opløses i 30 ml ætylacetat og der tilsættes 3,7 g (20 mmol) PFPOH hvorpå blandingen afkøles til en temperatur på højst 5°C og der tilsættes 4,12 g (20 mmol) DCC. Reaktionsblandingen omrøres ved denne temperatur i 1 time og derefter frafiltreres det udskilte DCU, filtratet indampes og den som remanens vundne olie opløses i 30 ml n-hexan. Opløsningen henstår 1 time i køleskab og derefter frafiltreres det yderligere udskilte DCU og filtratet fortyndes med 70 ml n-hexan. Den fortyndede opløsning udrystes med 5 x 40 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og derefter 2 x 40 ml vand, tørres med vandfrit natriumsulfat og indampes. Den som remanens vundne olie krystalliserer ved henståen. Der vindes på

denne måde 8,48 g (97%) BOC-Cha-OPFP med smp. 75-77°C. $R_F(1) = 0,88$.

Beregnet for $C_{20}H_{24}O_4NF_5$ (437,41): C 54,92 H 5,53 N 3,20 F 21,72

Fundet: C 54,67 H 5,66 N 3,11 F 21,43%.

5 Trin 2: L-Cyklohexylalanyl-L-prolinamid-hydroklorid

2,28 g (20 mmol) H-Pro-NH₂ og 4,37 g (10 mmol) BOC-Cha-OPFP opløses i 40 ml DMFA og efter 5 minutters henståen inddampes opløsningen i vakuum. Den som remanens vundne olie opløses i 80 ml kloroform og opløsningen udrystes med 3 x 20 ml N salt-
 10 syre, 3 x 20 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og til sidst 1 x 20 ml vand, tørres med vandfrit natriumsulfat og inddampes. Den som remanens vundne olie opløses i 8 ml ætylacetat og der tilsættes 10 ml 5N saltsyre i ætylacetat, hvorpå reaktionsblandingen efter 1 times forløb fortyndes med æter. Det udskilte
 15 bundfald frafiltreres og tørres i vakuum over vandfrit natriumhydroxyd. Der vindes på denne måde 2,98 g H-Cha-Pro-NH₂·HCl svarende til 97% udbytte beregnet på BOC-Cha-OPFP. $R_F(4) = 0,33$.

Trin 3: Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-cyklohexylalanyl-prolinamid

20 2,43 g (8 mmol) H-Cha-Pro-NH₂·HCl og 3,60 g (8,4 mmol) Z-Glp-OPFP opløses i 25 ml DMFA og der tilsættes 1,12 ml (8 mmol) triætylamin. Efter 5 minutters forløb tilsættes der yderligere 1,12 ml (8 mmol) triætylamin og efter yderligere 20 minutters omrøring inddampes reaktionsblandingen i vakuum. For-
 25 dampningsremanensen opløses i 80 ml kloroform og opløsningen udrystes med 3 x 20 ml N saltsyre, 3 x 20 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning og til sidst 1 x 20 ml vand hvorpå den tørres med vandfrit natriumsulfat og inddampes. Den som remanens vundne olie bringes til krystallisation med æter; det vundne
 30 råprodukt (3,88 g) omkrystalliseres fra 30 ml ætylacetat. Der vindes 3,32 g (81%) Z-Glp-Cha-Pro-NH₂ med smp. 165-166°C. $R_F(2) = 0,17$. $[\alpha]_D^{25} = -67,3^\circ$ (c = 1 i eddikesyre).
 Beregnet for $C_{27}H_{36}O_6N_4$ (512,61): C 63,26 H 7,08 N 10,93
 Fundet: C 63,15 H 7,04 N 10,91%.

Trin 4: L-Pyroglutamyl-L-cyklohexylalanyl-L-prolinamid

3,07 g (6 mmol) Z-Glp-Cha-Pro-NH₂ opløses i 60 ml ætanol og til opløsningen sættes der 0,6 g 10% palladium-på-aktive-kul-katalysator hvorpå der i 2 timer ledes hydrogengas gennem opløsningen. Efter frafiltrering af katalysatoren ind-
 5 dampes filtratet og remanensen rives med æter. Der vindes på denne måde 2,15 g (95%) amorft, fast Glp-Cha-Pro-NH₂. $R_f(4) = 0,50$. $[\alpha]_D^{25} = -70,9^\circ$ ($c = 1$ i eddikesyre).

Eksempel 9

10 L-Pyroglutamyl-L-treonyl-L-prolinamid

Trin 1: O-Benzyl-L-treonyl-L-prolinamid-hydroklorid

1,43 g (12,5 mmol) H-Pro-NH₂ og 2,98 g (6,27 mmol) BOC-Thr(Bzl)-OPFP opløses i 20 ml DMFA og efter 5 minutters henstå-
 en indampes opløsningen i vakuum. Den som remanens vundne olie
 15 opløses i 30 ml kloroform og opløsningen udrystes med 2 x 10 ml N saltsyre og derefter 3 x 10 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning, tørres med vandfrit natriumsulfat og indampes. Den som fordampningsremanens vundne olie opløses i 4 ml ætylacetat og der tilsættes 5 ml 5N saltsyreopløsning i ætylacetat. Efter
 20 1 times henståen fortyndes reaktionsblandingen med æter og det dannede bundfald frafiltreres og tørres i vakuum over vandfrit natriumhydroxyd. Der vindes på denne måde 2,05 g (95%) H-Thr(Bzl)-Pro-NH₂,HCl. $R_f(4) = 0,40$.

25 Trin 2: Benzyloxykarbonyl-L-pyroglutamyl-L-O-benzyltreonyl-L-prolinamid

2,05 g (6 mmol) H-Thr(Bzl)-Pro-NH₂,HCl og 2,69 g (6,27 mmol) Z-Glp-OPFP opløses i 21 ml DMFA og til opløsningen sættes dråbevis 0,84 ml (6 mmol) triætylamin og efter 5 minutters hen-
 stående yderligere 0,84 ml (6 mmol) triætylamin. Efter 20 minut-
 30 ters omrøring indampes reaktionsblandingen i vakuum og remanensen opløses i 50 ml kloroform, hvorpå opløsningen udrystes med 2 x 10 ml N saltsyre og 3 x 10 ml N natriumhydrogenkarbonatopløsning, tørres med vandfrit natriumsulfat og indampes. Den som remanens vundne olie behandles med æter og afkøles
 35 hvorefter produktet størkner i amorf tilstand. Det på denne måde vundne råprodukt (2,76 g) opløses i ætylacetat og klares med

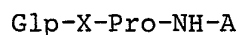
aktive kul. Efter filtrering inddampes filtratet og den faste, amorfe, opskummende remanens rives med æter. Der vindes 2,47 g (75%) Z-Glp-Thr(Bzl)-Pro-NH₂.

Trin 3: L-Pyroglutamyl-L-treonyl-L-prolinamid

- 5 2,04 g (3,7 mmol) Z-Glp-Thr(Bzl)-Pro-NH₂ opløses i 40 ml eddikesyre, der sættes 0,4 g 10% palladium-på-kul-katalysator til opløsningen og der ledes hydrogengas gennem blandingen i 4 timer. Efter frafiltrering af katalysatoren inddampes filtratet og remanensen rives med æter. Det på denne måde vundne
- 10 amorfe råprodukt (1,31 g) overføres på en kolonne indeholdende 30 g silikagel (partikelstørrelse 0,063 til 0,2 mm) og elueres med opløsningsmiddel (3). De eluatfraktioner som indeholder det rene produkt forenes og inddampes, og det som remanens vundne råprodukt behandles med æter. Der vindes 0,72 g (59,5%) Glp-
- 15 Thr-Pro-NH₂. $R_f(4) = 0,16$. $[\alpha]_D^{25} = -90,0^\circ$ (c = 1 i eddikesyre).
Aminosyreanalyse: Glu 1,00 (1,0), Thr 0,99 (1,0), Pro 1,03 (1,0).

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

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af TRH-analoge tripeptidamider med den almene formel



I

5 hvor

X betegner en L-norleucyl-, L-norvalyl-, L-prolyl-, L-2-aminobutyryl-, L-valyl-, L-treonyl-, L-isoleucyl-, L-2-aminodekanoyl- eller L-cyklohexylalanylgruppe, og

A betegner hydrogen, en alkylgruppe med 1-10 kulstofatomer
 10 eller en med en dimetylaminogruppe substitueret alkylgruppe med 1-3 kulstofatomer i alkyl delen,
 eller terapeutisk acceptable komplekser eller salte af disse forbindelser,

k e n d e t e g n e t ved at man opbygger tripeptidamiderne
 15 med den almene formel I, hvor X og A har de angivne betydninger, af de indgående aminosyrer eller aminosyrederivater ved inden for peptidkemien sædvanligt anvendte peptiddannede kondensations-reaktioner og fjernelse af eventuelle beskyttelsesgrupper fra den dannede forbindelse, hvorpå
 20 man om ønsket omdanner det vundne produkt i et terapeutisk anvendeligt kompleks eller salt.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at man N-acylerer et aminosyreamid med den almene formel H-Pro-NH-A, hvor A har de i krav 1 angivne betydninger,
 25 med en eventuelt beskyttet L-aminosyre H-X-OH, hvor X har den i krav 1 angivne betydning, og derefter N-acylerer det herved dannede dipeptidamid med L-pyroglutaminsyre eller et beskyttet og/eller aktiveret derivat deraf og fraspalter eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgrupper.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgninger nr. 1195/77 (freml.skrift 149111), 4522/77
 DE offentliggørelsesskrift nr. 2639393.
 ACT4 Polon.Pharm. XXXIII, nr. 1 (1976) side 81-86
 Merck Index 9. udgave 7251.