

NORGE

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 131170



(51) Int. Cl.² C 07 C 103/52

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

(21) Patentsøknad nr. 776/70

(22) Inngitt 5.3.1970

(23) Løpedag 5.3.1970

(41) Søknaden alment tilgjengelig fra 8.9.1970

(44) Søknaden utlagt og
utlegningsskrift utgitt 6.1.1975

(30) Prioritet begjært fra: 6.3., 28.5.1969 Japan,
nr. 17117/69, 41481/69

-
- (71)(73) SHIONOGI & COMPANY, LIMITED,
12, 3-chome, Dosho-machi, Higashi-ku,
Osaka, 553 Japan.
- (72) OTSUKA, Hideo, Toyonaka-shi, Osaka Pref. og
INOUE, Ken, Tarumi-ku, Kobe-shi, Hyogo Pref.,
Japan.
- (74) Siv.ing. Audun Kristensen.
- (54) Analogifremgangsmåte for fremstilling av et nytt,
terapeutisk aktivt oktadekapeptid.

Den foreliggende oppfinnelse angår en analogifremgangsmåte for fremstilling av det nye terapeutisk aktive oktadekapeptid β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-lysyl-L-lysyl-L-arginyl-L-argininamid, ikke giftige syreaddisjonssalter derav, eller komplekser derav med sink, polyglutaminsyre, polyaspartinsyre, kopoly-(glutamyl-tyrosin) eller blandinger av disse, og det særegne ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen er at aminosyrene β -

131170

alanin, L-tyrosin, L-serin, L-metionin, L-glutaminsyre, L-histidin, L-fenylalanin, L-tryptofan, glycin, L-lysin, L-prolin, L-valin og L-arginin i den ønskede rekkefølge og/eller peptidbrudd-stykker som inneholder disse aminosyrer i den ønskede rekkefølge, kondenseres til det angitte oktadekapeptid under anvendelse av innen peptidkjemien kjente metoder, idet en endestående karboksylgruppe og/eller aminogruppe aktiveres for kobling og de øvrige reaktive grupper beskyttes intermediært, og det resulterende oktadekapeptid eventuelt overføres i saltene eller kompleksene på i og for seg kjent måte.

Oktadekapeptidet, syreaddisjonssaltene og kompleksforbindelsene er nyttige som terapeutisk aktive forbindelser på grunn av deres sterke og langvarige virkning med hensyn til adrenalinstimulerende aktivitet, lipotropisk aktivitet og melanocytstimulerende aktivitet. Alle aminosyrer i den følgende beskrivelse har L-konfigurasjon med mindre annet er angitt. De forkortede betegnelser for aminosyrer, peptider og deres derivater tilsvarer forslaget for IUPAC-IUB Commission Nomenclature.

Det er fra en rekke laboratorier rapportert syntese av et stort antall av kortikotropin (ACTH)-peptider. Peptidanalogene er slike hvori individuelle aminosyrer i den naturlige sekvens er ombyttet med andre aminosyrer, f.eks. den første aminosyre serin med glycin eller D-serin, eller den fjerde aminosyre metionin med valin eller norleucin, eller den femte aminosyre glutaminsyre med glutamin, eller den syttende eller attende aminosyre arginin med lysin eller ornitin, eller den femogtyvende aminosyre aspartinsyre med valin. Selv om mange kortikotrope peptider med en litt modifisert aminosyre-sekvens er blitt syntetisert til denne dag, viste ingen en aktivitet som var større enn for naturlig kortikotropin, med meget få unntagelser. Blant disse peptider er det av spesiell interesse at peptidet D-Ser¹-Nle⁴-Val²⁵-ACTH(1-25)-NH₂, som inneholder D-serinresten ved aminoenden i stedet for nativt L-serin, en valinamidrest ved sin karboksylende i stedet for en aspartinsyrerest og, i stedet for metioninresten i 4-stillingen i kortikotropinet inneholdes en norleucinrest, har sterkere biologisk virkning enn det native

kortikotropin, som rapportert i litteraturen: *Experientia.*, 22 526 (1966). Det synes mest sannsynlig at den sterkere virkning som er påvist for D-Ser¹-Nle⁴-Val²⁵/ACTH(1-25)-NH₂ er en følge av peptidets større stabilitet med hensyn til innvirkningen av aminopeptidase og karboksypeptidase på grunn av nærværet av D-aminosyren ved aminoenden og valinamidet ved karboksylenden og det skyldes det forhold at oksydasjonen av metionin i 4-stillingen til metioninsulfoksyd, som ville resultere i inaktivering, ikke foregår under omsetningen som en følge av erstatningen av metionin-resten med norleucinresten. Selv om D-Ser¹-Nle⁴-Val²⁵-ACTH(1-25)-NH₂ er et utmerket kortikotropt peptid med meget sterk biologisk aktivitet, er dette peptid ikke nødvendigvis ideelt på grunn av at enkelte problemer må løses for praktisk bruk for behandling av mennesker og også fra et industrielt synspunkt. Siden D-Ser¹-Nle⁴-Val²⁵-ACTH(1-25)-NH₂ inneholder tre modifiserte aminosyrer, nemlig D-serin, norleucin og valin-rester, fryktes det at en anafylaktisk reaksjon kan opptre når forbindelsen tilføres mennesker på grunn av forskjellen i aminosyre-sekvensen mellom menneskelig kortikotropin og det syntetiske peptid. Det er vel kjent at den anafylaktiske reaksjon ofte forekommer når kommersielt tilgjengelig kortikotropin som skriver seg fra dyrekjertler fra svin, kveg, sauer o.l., tilføres mennesker. Dette uønskede fenomen kan være en følge av nærværet av artsforskjeller, dvs. strukturforskjeller ved 25- og 33-stillingene i aminosyresekvensene for menneskelige kortikotropin og animalsk kortikotropin, og kan også skyldes visse proteinlignende forurensninger som ikke fullstendig kan fjernes fra naturlig kortikotropin fra de nevnte dyr.

Videre, ved fremstilling av serinholdige peptider, er det kjent at reaktiviteten av hydroksylgruppen i serinet såvel som labiliteten for seryl-peptidbindinger under alkaliske betingelser, tendensen til β -eliminerende reaksjoner som danner dehydropeptidet og $N \longrightarrow O$ acylskiftingen gjør det meget vanskelig å fremstille serinholdige peptider som ofte følges av racemiseringer på grunn av labiliteten overfor alkaliske betingelser. Videre, da mange synteser, arbeidstid og arbeidskraft trenges for å oppnå et langkjedet peptid, er det under fremstilling av et kortikotropt meget aktivt peptid ønskelig at aminosyre-sekvensen er så kort som mulig.

131170

For å oppnå et kortikotrop meget aktivt peptid hvis aminosyre-sekvens er så kort som mulig, ble oktadekapeptidaminet tilsvarende de første atten aminosyrerester i kortikotropinet, med unntagelse av at karboksylenden var omdannet i amidet, syntetisert som rapportert i litteraturen, J. Am. Chem. Soc., 87 2696 (1965) og J. Biochem. (Tokyo), 58 512 (1965). Videre har det tidligere lyktes å syntetisere et oktadekapeptidamid hvori aminoende-serinet i kortikotropin er erstattet med glycinresten og karboksylenden er omdannet til amidet [Bull. Chem. Soc. Japan, 43 196 (1970)]. Begge peptider er meget aktive med hensyn til kortikotrop aktivitet. In vivo steroidogenese-aktivitet ved intravenøs tilførsel til rotter er lik aktiviteten av fåre-kortikotropin. Imidlertid er in vitro steroido-genese-aktiviteten noe mindre enn for fåre-kortikotropin.

Under undersøkelsene av kortikotrope peptider for å løse de tekniske problemer som er nevnt ovenfor, ble det oppdaget at et oktadekapeptid med formel β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-lysyl-lysyl-arginyl-argininamid, ikke-giftige syreaddisjonssalter derav og kompleksforbindelser med sink, polyaminosyrer eller blandinger derav viser markerte biologiske egenskaper, adrenalstimulerende virkning, lipotropisk aktivitet og melanocyt-stimulerende aktivitet, som alle er høyere enn for naturlig kortikotropin og for de syntetiske kortikotropin-peptider som hittil er kjent. Det ble også oppdaget at oktadekapeptidet har protraisert kortikotrop aktivitet, sannsynligvis på grunn av motstanden overfor innvirkning av aminopeptidase. Det ble også funnet at kompleksene derav har langvarig virkning. Derivatene har en mer markert biologisk virkning og utmerkede egenskaper fra industrielt og biologisk synspunkt i forhold til naturlig kortikotropin og beslektede kjente peptider med kortikotropisk aktivitet og kan fremstilles ved hjelp av den foreliggende fremgangsmåte i ren tilstand uten inaktivering, sidereaksjoner eller racemisering.

Polypeptider fremstilles ved hjelp av en rekke metoder, dvs. at aminosyrerestene i en angitt sekvens knyttes sammen en for en

eller i form av på forhånd syntetiserte peptidfragmenter eller bruddstykker. Aminosyren eller peptidenheten kan således knyttes sammen med en ytterligere aminosyre eller peptidfragmenter ved metoder som er kjente innen peptidkjemien.

Ved fremstilling av det foreliggende oktadekapeptid og utgangsforbindelsene kan derfor eventuelle frie funksjonelle grupper som ikke deltar i omsetningen med fordel beskyttes, særlig ved hjelp av grupper som lett kan elimineres ved metoder som acidolyse, hydrogenolyse eller hydrolyse. Karboksylgruppen beskyttes fordelaktig ved forestring, f.eks. med en lavere alkanol som metanol, etanol, propanol, isopropanol, tertiær butanol eller en lavere aralkanol som f.eks. benzylalkohol, p-nitrobenzylalkohol, p-metoksybenzylalkohol eller ved amiddannelse. Aminogruppen beskyttes fortrinnsvis ved innføring av en gruppe som f.eks. t-butylloksykarbonylgruppen, t-amyloksykarbonylgruppen, p-metoksybenzylloksykarbonylgruppen, benzyloksykarbonylgruppen, p-nitrobenzylloksykarbonylgruppen, tritylgruppen, 2-(p-difenyl)-isopropylloksykarbonylgruppen eller formylgruppen. For beskyttelse av guanidinogruppen i arginin anvendes fortrinnsvis nitrogruppen eller tosylgruppen, men det er ikke alltid nødvendig å beskytte guanidinogruppen i arginin under omsetningen. Også ϵ -aminogruppen i lysin kan med fordel beskyttes med t-butylloksykarbonylgruppen, t-amyloksykarbonylgruppen, benzyloksykarbonylgruppen eller 2-(p-difenyl)-isopropylloksykarbonylgruppen. Videre beskyttes fortrinnsvis γ -karboksylgruppen i glutaminsyre i form av en lavere alkylester - som f.eks. metyl-, etyl-, propyl- eller t-butyl-esteren eller lavere aralkylester som f.eks. benzyl-, p-nitrobenzyl- eller p-metoksybenzyl-esteren eller ved amiddannelse, og iminogruppen i histidin kan beskyttes med benzyloksykarbonylgruppen eller benzylgruppen.

Kondenseringsmetoden for dannelse av peptidbindinger omfatter f.eks. dicykloheksylkarbodiimid-metoden, azidmetoden, den reaktive estermetode med f.eks. cyanometylester, p-nitrofenyltiolester, p-nitrofenylester, N-hydroksyravsyreester, 8-kinolylester, 1-piperidylester, samt den blandede anhydridmetode, N-karboksyanhydridmetoden, tetraetylpyrofosfittmetoden, etylklor-

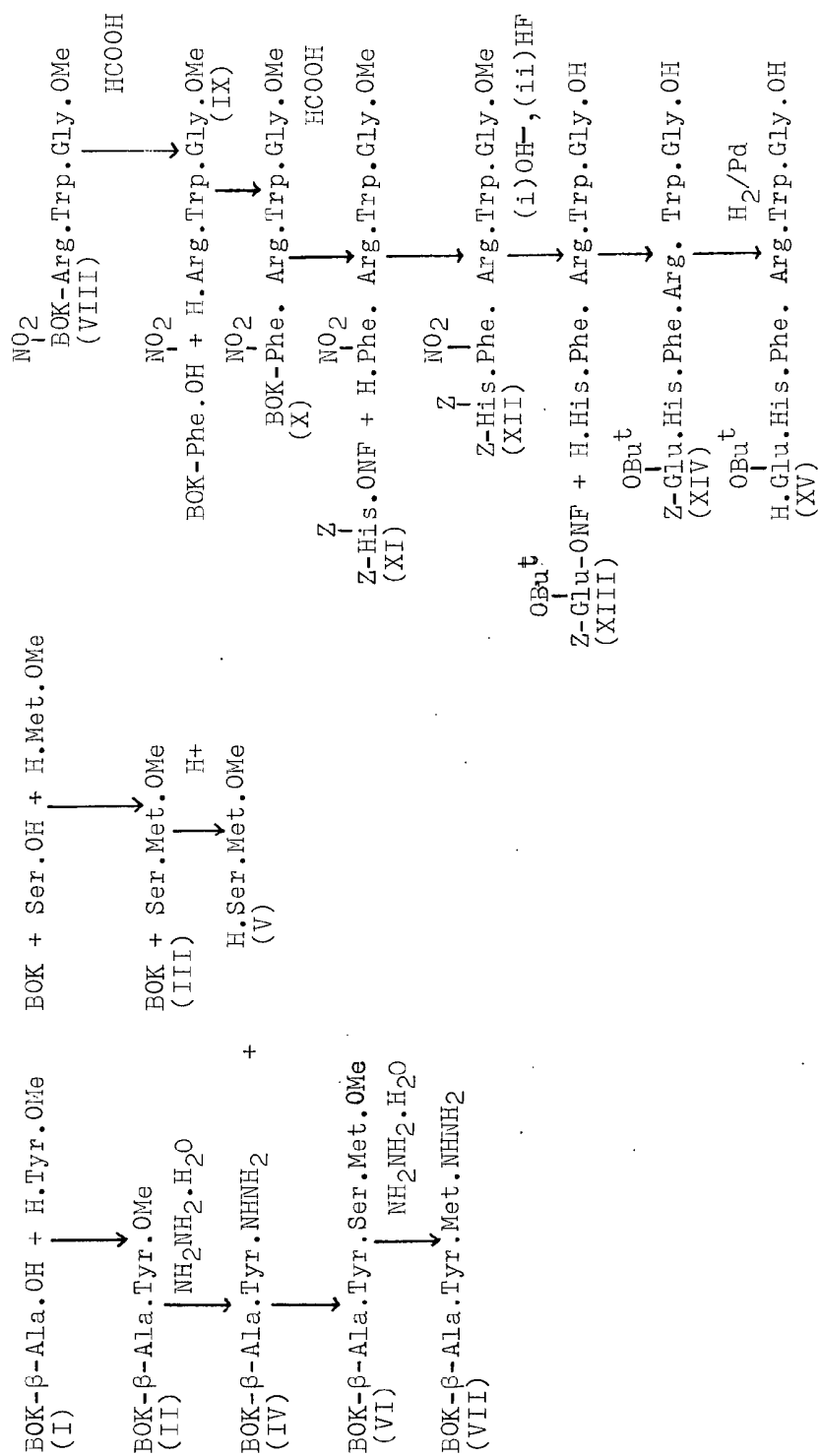
131170

fosfittmetoden eller kombinasjoner derav og de vanlige metoder som anvendes innen peptidkjemien. De ønskede peptider kan også fremstilles ved såkalt fastfasesyntese hvori peptidet syntetiseres ved å gå ut fra karboksylenden som knyttes på esterlignende måte til en polymer, og aminosyrene kondenseres på, den ene etter den andre. Alle de nevnte metoder kan anvendes for dannelsen av hvilke som helst peptidbindinger for fremstilling av det foreliggende okta-dekapeptid og derivater derav.

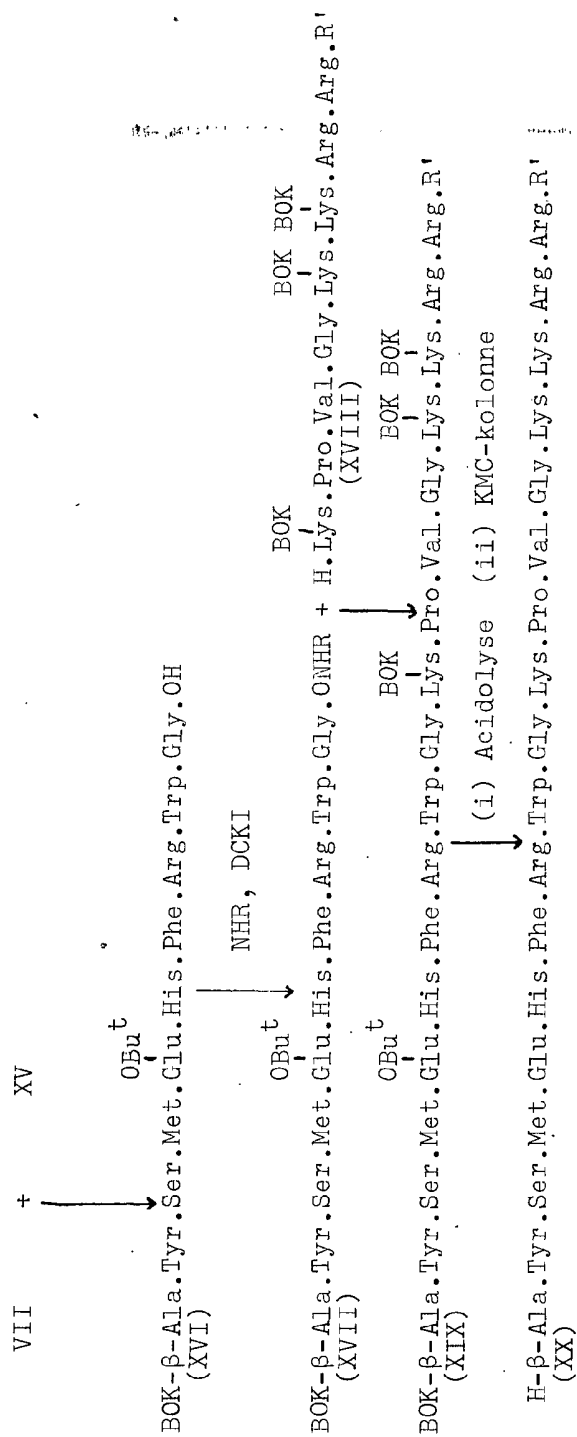
Som nevnt ovenfor er der flere mulige veier for fremstilling av okta-dekapeptidet fra aminosyrene eller peptidenhetene. Ved en fremgangsmåte kan okta-dekapeptidet med formel β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-lysyl-lysyl-arginyl-argininamid fremstilles ved å kondensere et dekapeptid med formel R_1 - β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl- Υ - R_2 -glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycin hvori R_1 er en aminobeskyttende gruppe og R_2 er en karboksylbeskyttende gruppe, med et oktapeptid med formel N^ϵ - R_3 -lysyl-prolyl-valyl-glycyl- N^ϵ - R_3 -lysyl- N^ϵ - R_3 -lysyl-arginyl-argininamid hvori R_3 er en aminobeskyttende gruppe i et inert løsningsmiddel som f.eks. dimetylformamid, dimetylsulfoksyd, pyridin, dimetoksyetan, heksametylfosfortriamid, dioksan eller blandinger derav ved en temperatur på fra -20 til $+50^\circ\text{C}$ i en periode på fra 2 til 96 timer, og fjerne beskyttelsesgruppene fra det resulterende beskyttede okta-dekapeptid med formel R_1 - β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl- Υ - R_2 -glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycyl- N^ϵ - R_3 -lysyl-prolyl-valyl-glycyl- N^ϵ - R_3 -lysyl- N^ϵ - R_3 -lysyl-arginyl-argininamid hvori R_1 , R_2 og R_3 har den tidligere angitte betydning, på i og for seg kjente måter, f.eks. ved acidolyse, hydrogenolyse eller hydrolyse.

Den mest foretrukne fremgangsmåte for fremstilling av okta-dekapeptidet er vist i følgende synteseskjema.

Syntesekjema for oktaðekapeptidet



(Skjema fortsatt fra forrige side)



I det foregående skjema er det gjort følgende forkortelser:

KM = karboksylmetylcellulose, DCKI = N,N'-dicykloheksyl-diimid, NHR = N-hydroksyravsyreimid, BOK = t-butyloksykarbonyl, OBu^t = t-butylester, $\text{R}' = \text{NH}_2$ eller OH, Z = benzyloksykarbonyl-resten, og ONF = p-nitrofenylester.

Som vist i synteseskjemaet kan det typiske N-terminale dekaeptid, t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl- γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycin, som er nyttig som mellomprodukt for fremstilling av det foreliggende oktadekaeptid, fremstilles ved å omsette t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionin-hydrazid med γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycin ved hjelp av azidmetoden. Tetrapeptidhydrazidet, t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metioninhydrazid, er nyttig som mellomprodukt for fremstilling av oktaeptidet og kan fremstilles ved å innføre t-butyloksykarbonylgruppen i β -alanin ved hjelp av et t-butyloksykarbonylerende middel som f.eks. t-butylazid-format, t-butyl-p-nitrofenylkarbonat eller t-butylklorformat eller lignende, kondensere det resulterende t-butyloksykarbonyl- β -alanin med tyrosinmetylester, omdanne den resulterende dipeptidmetylester til det tilsvarende hydrazid med hydrazidhydrat, omsette t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosinhydrazidet med seryl-metioninmetylester ved hjelp av azidmetoden og omdanne tetrapeptidesteren til det tilsvarende hydrazid med hydrazinhydrat. Det tilsvarende t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionin kan oppnås på lignende måte som her beskrevet.

Heksaeptidet, γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycin er en kjent forbindelse og er beskrevet i litteraturen, Bull.Chem.Soc.Japan, 38 1148 (1965), men det er lykket å syntetisere heksaeptidet ved hjelp av en forbedret metode som bidrar til fremstilling av oktadekaeptidet i en renere tilstand og i et høyere utbytte enn tidligere. Den forbedrete prosess for fremstilling av heksaeptidet omfatter bruk av maursyre for å fjerne t-butyloksykarbonylgruppen fra de beskyttede tryptofan-peptider uten spalting av tryptofanresten og anvendelse av hydrogenfluorid for å fjerne nitrogruppen fra nitroargininresten

131170

uten å påvirke den syrelabile tryptofanrest. Det er vel kjent at tryptofanholdige peptider som behandles i et surt medium ofte oppnås i lavt utbytte på grunn av dannelsen av biprodukter, [Helv.Chim.Acta., 41 1867 (1958), J.Am.Chem.Soc., 82 2062 (1960)]⁷. Det er også kjent at reduksjonen av en nitroargininrest i en peptidkjede ofte krever lang hydrogeneringstid [Can.J.Chem., 38 1946 (1960)]⁷ og at den katalytiske reduksjon ofte stopper ved nivået for aminoguanidin [Helv.Chim.Acta., 44 2042 (1961)]⁷. Ved fremstilling av det foreliggende heksapeptid, som inneholder de nevnte aminosyrerester, kan heksapeptidet oppnås med høyt utbytte og uten sidereaksjoner ved å anvende den forbedrede metode. Dette vil si at γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycin kan fremstilles ved å fjerne t-butyloksykarbonylgruppen fra N^α -t-butyloksykarbonyl- N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycin-metylesteren med maursyre, omsette det resulterende tripeptid med t-butyloksykarbonyl-fenylalanin ved hjelp av dicykloheksylkarbodiimidmetoden, fjerne t-butyloksykarbonylgruppen fra det resulterende tetrapeptid, t-butyloksykarbonyl-fenylalanyl- N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycinmetylesteren med maursyre, omsette det resulterende tetrapeptid med N^α - N^{Im} -dibenzylloksykarbonyl-histidin p-nitrofenylester til å gi det tilsvarende pentapeptid, N^α , N^{Im} -dibenzylloksykarbonyl-histidyl-fenylalanyl- N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycinmetylester, som hydrolyseres, behandles med hydrogenfluorid og omsettes med N^α -benzylloksykarbonyl- γ -t-butyl-glutaminsyre p-nitrofenylester, og det resulterende N^α -benzylloksykarbonyl- γ -t-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycin hydrogeneres.

I den ovennevnte omsetning gjennomføres spaltingen av t-butyloksykarbonyl-gruppen med maursyre ved en temperatur på fra 20 - 60°C i fra 2 til 4 timer under anvendelse av tilnærmet en fem-til femtendobbelt mengde av maursyre i forhold til t-butyloksykarbonyl-peptidet (regnet på vekten). Nitrogruppen fjernes ved å oppløse nitroarginylpeptidet i hydrogenfluorid (omtrent en fem- til ti-dobbelt vektmengde av peptidet) og oppløsningen henses ved en temperatur på fra 0 til 25°C i 30 til 60 min.

Det typiske C-terminale oktapeptid med formel N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl-arginyl-Y hvori Y er en argininrest eller en argininamidrest, kan fremstilles ved hjelp av den metode som er beskrevet i litteraturen: Bull.Chem.Soc.Japan, 39 882 (1966). Det ønskede oktapeptid kan således fremstilles ved å omsette t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl- γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycin med N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl-arginyl-Y hvori Y har den ovenfor angitte betydning, ved hjelp av dicykloheksylkarbodiimidmetoden, eller N-hydroksyravsyreimidestermetoden eller en kombinasjonsmetode av disse ved en temperatur på fra -20 til $+50^{\circ}\text{C}$ i fra 2 til 96 timer og å fjerne alle de beskyttende grupper fra det resulterende beskyttede oktapeptid av t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl- γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl-arginyl-Y hvori Y har den ovenfor angitte betydning, i et surt medium som f.eks. hydrogenhalogenid, hydrogenhalogensyre, trifluoeddiksyre, maursyre, eddiksyre eller blandinger derav ved en temperatur fra -10 til $+40^{\circ}\text{C}$ i fra 10 til 90 min.

Ved en annen fremgangsmåte kan oktapeptidet fremstilles ved å kondensere tetrapeptidet, t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionin, med et tetrapeptid, γ -t-butyl-glutamyl (eller glutaminyll)-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl-arginyl-Y hvori Y har den ovenfor angitte betydning, på i og for seg kjent måte.

Oktapeptidet kan også fremstilles ved å kondensere t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl- γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl-prolyl-valyl-glycin med N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl- N^{ϵ} -t-butylloksykarbonyl-lysyl-arginyl-argininamid, på en i og for seg kjent måte.

Alle beskyttende grupper som anvendes i disse prosesser kan fjernes ved katalytisk reduksjon, ved hjelp av natrium i flytende ammoniakk, hydrolyse eller behandling med et surt medium som f.eks. trifluoreddiksyre, eddiksyre, maursyre, hydrogenhalogenid (f.eks. hydrogenfluorid, hydrogenbromid eller hydrogenklorid), en hydrogenhalogensyre som f.eks. fluorhydrogen-syre, bromhydrogensyre, saltsyre eller blandinger derav.

Det erholdte oktadekapeptid kan renses ved i og for seg kjente metoder som f.eks. kolonnekromatografering med ioneutbyttings-harpiks, ioneutbyttingscellulose eller metoden med motstrøms-fordeling.

Oktadekepeptidet fremstilles således i form av baser eller farmasøytisk tålbare ikke-giftige syreaddisjonssalter derav, avhengig av de anvendte reaksjonsbetingelser. Saltene kan fremstilles ved å behandle peptidene med uorganiske syrer som f.eks. hydrohalogensyrer, hydrogenhalogenider, svovelsyre eller fosforsyre, eller med organiske syrer som f.eks. eddiksyre, maursyre, propionsyre, glykolsyre, melkesyre, pyrodruesyre, oksalsyre, malonsyre, ravsyre, maleinsyre, fumarsyre, vinsyre, sitronsyre, benzosyre, kanelsyre, metansulfonsyre, benzensulfon-syre, eller toluensulfonsyre på i og for seg kjent måte.

Det således fremstilte oktadekapeptid viser markert biologisk virkning som adrenalstimulerende aktivitet, lipotropisk aktivitet og melanocytstimulerende aktivitet som er overlegen de tilsvarende for naturlig kortikotropin og beslektede kjente peptider, og er derfor anvendelig som medisiner, spesielt for behandling av akutt eller kronisk artikulær reumatisme og allergiske sykdommer i forskjellige organer i mennesker og dyr. De forskjellige farmakologiske egenskaper av oktadekapeptidet skal vises i det følgende sammen med de biologiske data.

Prøver for kortikotropisk aktivitet av oktadekapeptidet ble utført ved hjelp av fem forskjellige fremgangsmåter, i sammen-ligning med de tilsvarende for nativt fårekortikotropin (α_s -ACTH), ACTH(1-18)-NH₂, og Gly¹-ACTH(1-18)-NH₂. Den adenale ascorbinsyre-depletterende aktivitet i hypofysektomisert rotte

ble bestemt ved metoden i henhold til United States Pharmacopeia XVII, 147 (1965). In vitro steroidogenisk aktivitet ble bestemt ved hjelp av metoden til Saffran og Schally [Endocrinol., 56 523 (1955)]. In vivo steroidogenisk aktivitet ved intravenøs tilførsel til hypofysektomisert rotte ble bestemt ved metoden til Lipscomb og Nelson [Endocrinol., 71 13 (1962)] med en mindre modifikasjon [A. Tanaka og C.H.Li. Endocrinol.Japonica., 13 180 (1966)]. In vivo steroidogenisk aktivitet ble også bestemt i deksametason-pentobarbital-forhåndsbehandlet mus [A. Tanaka og N. Nakamura, "Integrative mechanism of neuroendocrine system", Hokkaido University Medical Library Series, Vol. 1 49 (1968)]. I tillegg ble steroidogenisk aktivitet ved intramuskular tilførsel til hypofysektomisert rotte bestemt, hvor et preparat (0,05 ml/rotte) ble injisert inn i lårmuskelen og en blodprøve ble tatt fra abdominal aorta 30 min. etter injeksjonen. Under eksperimentet ble Third USP Corticotropin Reference Standard anvendt som standard og produksjonen av 11-hydroksykortikosteroider (11-OHCS) ble bestemt ved hjelp av fluorofotometrisk metode til Peterson [J.Biol.Chem., 225 25 (1957)]. For hver prøvemethode ble flere bestemmelser utført og de uavhengig oppnådde data ble underkastet statistisk behandling ved hjelp av Sheps og Moore fremgangsmåte [J.Pharmacol.Extl.Therap., 128 99 (1960)]. Resultatene for disse prøver på det foreliggende okta-dekapeptid er gitt i den følgende tabell, i sammenligning med kjente kortikotropinpeptider og naturlig kortikotropin.

Tabell 1

Adrenokortikotrop aktivitet for fårekortikotropin og beslektede syntetiske okta-dekapeptider.

Metode	Tilførselsmåte	Peptid			
		Ia	Ib	I	α_s -ACTH
Adrenal ascorbin-syredepleksjon	subcutan	45,4	25,6	135	120
In vitro steroidogenese	in vitro	13,7	20,8	237	120
In vivo steroidogenese	intravenøs	92,0	167	125-285	100-180

Forts.

In vivo steroido-
genese i:deksametason-
nembotal-mus

intravenös

139

70-
168

259

-

hypofyseкто-
misert rotte,
perifert blod

intramuskulær

-

35,4

124

-

Merk:

Aktivitetene er uttrykt i USP-enheter/mg, i forhold til Third USP Corticotropin Reference Standard. Forkortelsene er som følger: Ia = ACTH(1-18)-NH₂, Ib = Gly¹-ACTH(1-18)-NH₂, I = (β-Ala¹)-ACTH(1-18)-NH₂. α_s = fårekortikotropin.

Som vist i tabell 1, er peptidet I fremstilt ved hjelp av den foreliggende fremgangsmåte sterkt aktivt i alle henseender hva angår adrenal-stimulerende aktivitet. In vivo steroidogen aktivitet for I har samme størrelsesorden som for Ia og Ib og α_s-ACTH når det tilføres ved intravenøs injeksjon. Peptidet I har imidlertid en slående større aktivitet enn peptidet Ia og Ib hva angår in vitro steroidgenese og adrenal ascorbinsyre-depleksjonsprøve. I tillegg er det verdt å legge merke til at potensforholdene for subkutan eller in vitro vs. intravenøs tilførsel er 1 til 0,5 for peptidet I, mens derimot forholdene for peptidene Ia og Ib er 1/7 til 1/8. Peptidet I er i denne henseende mye nærmere beslektet enn forbindelsene Ia og Ib til det naturlige hormon α_s-ACTH som har et tilsvarende tallmessig forhold på 1/1.

Figur 1 viser at (β-Ala¹)-ACTH(1-18)-NH₂ (I) forblir aktivt i lengre tid enn Gly¹-ACTH(1-18)-NH₂ (Ib) og naturlig ACTH når peptidene I og Ib (5 μg/rotte) (1 mg peptid/ml) og naturlig ACTH (125mU) tilføres lårmuskelen i hypofysektomiserter rotter ved intramuskulær injeksjon hvor den steroidogene aktivitet uttrykkes regnet som 11-hydroksykortikosteroid (11-OHCS)-nivået i plasma.

Oktadekapeptidet, (β-Ala¹)-ACTH(1-18)-NH₂ (I) fremviser en markert høy lipotropisk aktivitet som i den følgende tabell sammenlignes med aktivitetene for syntetiske peptider; ACTH(1-18)-NH₂ (Ia), Gly¹-ACTH(1-18)-NH₂ (Ib) og fårekortikotropin (α_s-ACTH).

131170

Tabell 2

In vitro lipotrop aktivitet for naturlig kortikotropin og beslektede syntetiske oktadekapeptider.

	Minste effektive dose (10^{-6} mg/50 mg vev)			
	Ia	Ib	I	α_s -ACTH
Rotte-fettvev	3,0	6,3	0,62	6,0
Kanin-fettvev	0,004	0,35	0,065	7,1
Rotte/kanin-forhold, tilnærmet	750	20	10	1

Merk:

Den lipotropiske aktivitet ble bestemt ved hjelp av den metode som er beskrevet av Tanaka et al (Arch.Biochem.Biophys., 99 294 (1962), med rotte-epidymal-fettvev og kanin-perirenal-fettvev. Økningen i konsentrasjonen av ikke-forestret fettsyre i både medium og vev er parameteren. Aktiviteten uttrykkes som minste effektive dose pr. 50 mg vev.

Det fremgår klart av tabellen at oktadekapeptidet I fremstilt ved den foreliggende fremgangsmåte er omtrent ti ganger mer aktivt med hensyn til lipotrop aktivitet enn Ia, Ib og α_s -ACTH ved prøve i rotte. En mindre mengde av forbindelsen I kan utøve aktiviteten i kaniner i sammenligning med aktivitet i rotter. Det samme forhold observeres med de andre peptider Ia og Ib. Det skal imidlertid legges merke til at forholdet mellom minste-effektive dose i rottefett og tilsvarende i kaninfett er mindre for I enn for Ib og Ia. Dette forhold betyr at peptidet I fremstilt i henhold til den foreliggende fremgangsmåte har mye større likhet med naturlig hormon enn peptidene Ia og Ib.

Figurene 2 og 3 viser inaktiveringsmønstrene for I og Ib som lipotrope midler i friskt plasma henhv. i buffer inneholdende rottemuskelfragmenter. Der var ingen vesensforskjell mellom I og Ib i tilfelle av plasma, mens derimot inaktiveringen for I var markert forsinket i forhold til Ib i tilfelle av vev. Inaktivering av lipotrop aktivitet av plasma og vev ble utført på følgende måte. En peptidprøve oppløses i det friske plasma fra anestetiserte rotter eller i Krebs-Ringer bikarbonatbuffer inneholdende storfe-

131170

serumalbumin, lårmuskelfragmenter av rotter, og glucose. Blandingen inkuberes så ved 37°C og prøver tas fra inkubasjonsblandingen og prøves på lipotrop aktivitet ved hjelp av ovennevnte metode etter 0,5, 1, 2 og 4 timers inkubasjonstid.

Biologisk halveringstid for $(\beta\text{-Ala}^1)\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ (I) injisert intravenöst i hypofysektomisert rotte med vekt 200 - 250 g ble målt. Blodprøver ble tatt fra abdominal aorta etter forskjellige tidsrom etter injeksjonen. Det uttatte plasma ble innstilt til pH 4 - 5 med N saltsyre og parameteren for den biologiske aktivitet som var tilbake i plasmaet var in vitro lipotrop aktivitet, under anvendelse av det førnevnte rotte-epidymalfett. Resultatene er vist i den følgende tabell i sammenligning med lipotrop aktivitet for naturlig kortikotropin (ACTH) og $\text{Gly}^1\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ (Ib).

Tabell 3

In vitro lipotrop aktivitet for $(\beta\text{-Ala}^1)\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$, $\text{Gly}^1\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ og naturlig kortikotropin (intravenøs injeksjon)

Tid etter injeksjon (min.)	Naturlig ACTH NEFA* produksjon ($\mu\text{Eq}/100\text{ mg}$)	Ib NEFA* produksjon ($\mu\text{Eq}/100\text{ mg}$)	I NEFA* produksjon ($\mu\text{Eq}/100\text{ mg}$)
0	0.129 $\pm$ 0.028	0.094 $\pm$ 0.016	0.179 $\pm$ 0.076
0.5	3.082 $\pm$ 0.447 (100%)**	3.004 $\pm$ 0.236 (100%)**	2.148 $\pm$ 0.228 (100%)**
1	2.587 $\pm$ 0.556 (83%)	1.217 $\pm$ 0.139 (39%)	1.140 $\pm$ 0.099 (49%)
2	2.409 $\pm$ 0.337 (77%)	1.622 $\pm$ 0.239 (53%)	0.751 $\pm$ 0.053 (29%)
4	2.396 $\pm$ 0.364 (77%)	0.777 $\pm$ 0.113 (24%)	0.815 $\pm$ 0.090 (32%)
8	1.108 $\pm$ 0.180 (33%)	0.243 $\pm$ 0.087 (5%)	0.431 $\pm$ 0.079 (13%)
12	-	0.252 $\pm$ 0.063 (5%)	0.487 $\pm$ 0.180 (16%)
16	0.380 $\pm$ 0.056 (9%)	0.263 $\pm$ 0.079 (6%)	0.512 $\pm$ 0.055 (17%)
32	0.212 $\pm$ 0.028 (3%)	-	-

* NEFA = ikke-forestret fettsyre

*** Tallene i parentes er de relative aktiviteter oppnådd for verdier 0,5 min. etter tilsetning av hvert hormon.

Eq = ekvivalenter.

Fra dataene i ovenstående tabell ble halveringstiden for naturlig ACTH, Ib og I med hensyn til in vitro lipotrop aktivitet beregnet å være 266 sek., 117 sek. og 188 sek., og de lipotrope aktivitetsmønstre for peptidene er gitt i fig. 4. Det kan sies at $(\beta\text{-Ala}^1)\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ (I) bibeholdes i plasmaet i vesentlig lengre tidsrom enn $\text{Gly}^1\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ (Ib).

På tilsvarende måte ble den biologiske halveringstid for I injisert intramuskulært i hypofysectomisert rotte målt. Resultatene er gitt i den følgende tabell og fig. 5.

Tabell 4

Lipotrop aktivitet for naturlig kortikotropin (ACTH), $\text{Gly}^1\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ (Ib) og $(\beta\text{-Ala}^1)\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ (I) (intramuskulær injeksjon).

Tid etter injeksjon (min.)	ACTH NEFA produksjon ($\mu\text{Eq}/100\text{ mg}$)	Ib NEFA produksjon ($\mu\text{Eq}/100\text{ mg}$)	I NEFA produksjon ($\mu\text{Eq}/100\text{ mg}$)
0	0,097 $\pm$ 0,032	0,033 $\pm$ 0,033	0,193 $\pm$ 0,060
2	0,922 $\pm$ 0,540 (48,5%)	-	-
5	1,693 $\pm$ 0,356 (93,9%)	1,772 $\pm$ 0,322 (57,7%)	-
10	1,797 $\pm$ 0,392 (100%)	3,047 $\pm$ 0,229 (100%)	3,630 $\pm$ 0,631 (100%)
20	1,264 $\pm$ 0,320 (68,6%)	1,568 $\pm$ 0,235 (50,9%)	2,080 $\pm$ 0,285 (54,9%)
30	1,061 $\pm$ 0,396 (56,7%)	1,727 $\pm$ 0,429 (56,2%)	3,558 $\pm$ 0,407 (97,9%)
60	0,474 $\pm$ 0,302 (22,2%)	1,977 $\pm$ 0,098 (64,5%)	3,383 $\pm$ 0,542 (92,8%)
90	0,209 $\pm$ 0,056 (6,6%)	1,390 $\pm$ 0,121 (45,0%)	1,876 $\pm$ 0,337 (49,0%)

Merk: I ovenstående kolonner er tallene i parentes relative lipotropaktiviteter for de verdier som oppnås 10 min. etter injeksjon av hvert hormon.

Halveringstiden for ACTH, Ib og I ble beregnet til 1389 sek., 4516 sek. og 4516 sek. Det bemerkes at halveringstiden for I fremstilt ved den foreliggende fremgangsmåte er omtrent tre ganger så lang som for naturlig kortikotropin, hvilket klart fremgår av fig. 5.

Stabiliteten for $(\beta\text{-Ala}^1)\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ (I) mot innvirkning av svinenyre-leucin-aminopeptidase (LAP) ble sammenlignet med tilsvarende for $\text{ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ (Ia) og $\text{Gly}^1\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ (Ib). Fig. 6 viser virkningen av diisopropylfluorfosfat (DFF)-behandlet aminopeptidase på peptidene I, Ia og Ib. Det sees av figuren at okta-dekapeptidet som fremstilles ved den foreliggende fremgangsmåte kan bevares i lengre tid enn de kjente peptider Ia og Ib uten hurtig inaktivering ved et angrep av aminopeptidaser i vevet, og peptidet I er derfor meget nyttig for terapeutiske formål. Prøvene på stabiliteten for de syntetiske peptider skal beskrives detaljert i det følgende.

Før prøvene ble et kommersielt tilgjengelig LAP-preparat (Product of Washington Biochemical Co., Freehold, New Jersey, USA) funnet å hydrolysere $(\beta\text{-Ala}^1)\text{-ACTH}(1-10)\text{-OH}$ (fremstilt fra det tilsvarende beskyttede dekapeptid t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl- γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyll-tryptofyl-glycin (XVI) ved behandling med maursyre) og $(\beta\text{-Ala}^1)\text{-ACTH}(1-18)\text{-NH}_2$ (I), men ikke β -alanyl-tyrosyl-seryl-metioninhydrazid (fremstilt fra t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metioninhydrazid (VII) ved behandling med maursyre). Siden det ikke kunne oppdages noe β -alanin i de enzymatiske prøver ved hjelp av aminosyreanalysator må den observerte hydrolyse skyldes nærværet av en endopeptidase som forurensar LAP-preparatet. Denne tilsynelatende manglende stabilitet for β -alanyl-peptider overfor LAP-preparatet forsvant fullstendig når enzym-preparatet ble behandlet med diisopropylfluorfosfat (DFF). Med det DFF-behandlede LAP ble Ser^1 -peptid (Ia) hydrolysert hurtigere enn Gly^1 -peptid (Ib) og ingen hydrolyse ble observert med $\beta\text{-Ala}^1$ -peptid (I) innenfor målenøyaktigheten.

Det DFF-behandlede LAP ble oppnådd ved å dialysere en suspensjon av enzym i 75% mettet ammoniumsulfat ved 4°C for bruk mot 0,005 M

magnesiumklorid, fortynning av LAP-suspensjon (5 mg enzym) til 1/5 konsentrasjon med 0,0005 M Tris buffer, tilsetning til den fortynnede enzymoppløsning av 0,08 ml M diisopropylfluorfosfat i isopropylalkohol, blandingen inkuberes ved 37°C i 45 min. og deretter dialyseres blandingen mot 0,0005 M Tris buffer ved 4°C.

LAP-aktiviteten for enzymoppløsningen ble bestemt ved pH 8,3 og 25°C i henhold til Tuppy et al [2. Physiol. Chem., 329 278 (1962)] med noen modifikasjoner under anvendelse av L-leucin p-nitro-anilid (LNA) som substrat. En LAP-enhet ble for formålet definert som den mengde enzym som frembragte en økning i adsorpsjonen ved 400 m μ på 0,001 pr. min. over kontrollprøven, under anvendelse av 1-cm celler i et Hitachi fotoelektrisk spektrometer.

For målingene av spaltningen av syntetisk substrat med LAP ble en blanding omfattende en del 0,1 mM substrat i vann, en del 0,05 M Tris buffer (pH 8,3) og en halv del enzym (4,88 enheter/ml, LNA som substrat) inkubert ved 37°C. Fra den inkuberte blanding ble 0,5 ml prøver trukket ut og med en gang blandet med 0,5 ml ninhydrin-reagens og blandingen ble så oppvarmet i et kokende vannbad i 15 min. Etter avkjøling og passende fortynning med 50% etanol ble adsorpsjon ved 570 m μ bestemt i et Hitachi-spektrofotometer. For hver prøve ble kontroll-inkubasjonsblandinger uten substrat eller uten enzym analysert. Ved ninhydrin-reaksjonen ble også en standard oppløsning av L-leucin også kontrollert hver gang som en referanse. Resultatene for den enzymatiske spaltning av peptider I, Ia og Ib ved hjelp av DFF-behandlet LAP er vist i fig. 6 som ovenfor nevnt, hvor frigivingen av aminosyrer er angitt på grunnlag av leucin-konsentrasjonen.

Prøven for in vitro melanocyt-stimulerende aktivitet for (β -Ala¹)-ACTH(1-18)-NH₂ ble utført ved en metode utviklet av K. Shizume, A.B. Lerner og T.B. Fitzpatrick (Endocrinol., 54 553, 1954) under anvendelse av Rana pipiens som forsøksdyr, i sammenligning med Gly¹-ACTH(1-18)-NH₂ og ACTH(1-24)-OH ("Synacthen", fremstilt av Ciba Co.). Naturlig rent α -melanocyt-stimulerende hormon (α -MSH) ble anvendt som referansestandard. Resultatene er vist i den følgende tabell.

131170

Tabell 5

In vitro melanocyt-stimulerende aktivitet for (β -Ala¹)-ACTH(1-18)-NH₂, Gly¹-ACTH(1-18)-NH₂ og ACTH(1-24)-OH.

Forbindelse	MSH aktivitet (enheter/g)
(β -Ala ¹)-ACTH(1-18)-NH ₂	9,6 x 10 ⁹
Gly ¹ -ACTH(1-18)-NH ₂	6,7 x 10 ⁸
ACTH(1-24)-OH	2,1 x 10 ⁸

Den melanocytstimulerende aktivitet for (β -Ala¹)-ACTH(1-18)-NH₂ er slående høyere enn for Gly¹-ACTH(1-18)-NH₂ og ACTH(1-24)-OH. I tillegg, siden naturlig svinekortikotropin fremviser melanocytstimulerende aktivitet på 1,7 x 10⁸ enheter/g som rapportert av R. G. Shepherd et al., J.Am.Chem.Soc., 78 5051 (1956), er den melanocytstimulerende aktivitet for (β -Ala¹)-ACTH(1-18)NH₂ fremstilt ved hjelp av den foreliggende fremgangsmåte omtrent 50 ganger så høy som for naturlig svinekortikotropin.

Oktadekapeptidet som fremstilles ved den foreliggende fremgangsmåte kan omdannes til tilsvarende komplekser med forbindelser som sinkklorid, sinkhydroksyd, sinkacetat og sinksulfat, eller med poly-aminsyrene poly-L-glutaminsyre, poly-D-glutaminsyre, poly-DL-glutaminsyre, poly-L-aspartinsyre, poly-D-aspartinsyre, poly-DL-aspartinsyre, sampoly-L-glutamyl-tyrosin eller blandinger derav, som viser utmerkede egenskaper med hensyn til langvarig aktivitet i blodet sammenliknet med det enkle oktadekapeptid.

Når f.eks. et sinkkompleks av (β -Ala¹)-ACTH(1-18)-NH₂, som omfatter peptidet (0,5 mg), 40 mM sinkklorid (0,25 ml), natriumklorid (4,5 mg) og 40 mM dinatriumhydrogenfosfat (0,25 ml) tilføres i rotter ved intramuskulær injeksjon (5 μ l/rotte), ble mengden av 11-hydroxycortikosteroid i plasma (2 timer etter injeksjonen) funnet å være 80 μ g/ml, men i tilfellet av det preparat som manglet sinkkloridet var mengden av kortikosteroid 6 μ g/ml. Det er derfor fordelaktig å

anvende kompleksene for terapeutiske formål. Kompleksene kan oppnås ved å behandle oktadekapeptidet med en sink-forbindelse, en polyaminosyre eller blandinger derav i et vektforhold på omtrent 1:0,1-20 ved svakt sure betingelser, særlig pH 6,5 til 7,0. Ved å anvende polyaminosyren er den foretrukne molekylvekt for polyaminosyren fra 1.000 til 100.000, særlig 2.000 til 6.000. Ved fremstilling av kompleksene kan andre passende bærere, konserverende midler, buffere, stabiliserende midler og isotonerende midler tilsettes om så behöves.

De ovenfor beskrevne prøvedata er eksempelvis. Forbindelsene fremstilt ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen er generelt meget nyttige og fordelaktige for terapeutiske formål, f.eks. behandling av akutt eller kronisk artikulær reumatisme og allergiske lidelser i forskjellige organer i dyr og mennesker.

Det omhandlede oktadekapeptid, syreaddisjonssalter og kompleksforbindelser derav kan således tilføres oralt eller parenteralt på i og for seg kjente måter, f.eks. i form av injeksjoner, væsker, suspensjoner, emulsjoner, aerosoler eller tabletter, eller i blanding med passende bærere, stabiliseringsmidler, emulgatorer, konserveringsmidler, buffere, isotonerende og/eller fuktmidler, bare preparatene inneholder en terapeutisk aktiv mengde av den aktive bestanddel.

Den effektive dose kan lett bestemmes av medisinere på basis av de heri beskrevne data. F.eks. er en typisk klinisk dose på 0,2 U/kg til 0,8 U/kg for normale voksne personer. Oktadekapeptidet tilføres med fordel i doseform ved injeksjon og tilførselen gjentas så ofte som det kreves i samsvar med legens angivelse.

De følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen. Vektdeler i disse eksempler har samme forhold til volumdelar som g til ml.

Eksempel 1

Fremstilling av N^α-t-butyloksykarbonyl-β-alanyl-tyrosyl-seryl-metioninhydrazin (VII)

1) N^α-t-butyloksykarbonyl-β-alanin (I).

β-alanin (8,91 g) oppløses i N natriumhydroksyd (100 ml) og til denne oppløsning tilsettes natriumhydrogenkarbonat (21,0 g) og dioksan (70 ml). Løsningen omrøres ved 50°C og en oppløsning av t-butylazidformat (17,2 g) i dioksan (30 ml) tilsettes dråpevis dertil. Blandingen omrøres i 41,5 time ved den samme temperatur og konsentreres under redusert trykk til omtrent 100 ml volum. Konsentratet kjøles med is og innstilles til pH 2 med 4N saltsyre (180 ml). Oppløsningen ekstraheres med iskold etylacetat (omtrent 100 ml), tørres over vannfritt natriumsulfat og konsentreres under redusert trykk og gir en sirupaktig rest. Resten krystalliseres fra etylacetat/petroleter og gir det ønskede produkt (12,6 g) med smeltepunkt 77 til 78°C.

Analyse beregnet for C₈H₁₅NO₄: C, 50,78; H, 7,99; N, 7,40.

Funnet: C, 50,99; H, 8,06; N, 7,47.

2) N^α-t-butyloksykarbonyl-β-alanyl-tyrosinmetylester (II)

Tyrosinmetylesterhydroklorid (3,48 g) oppløses i vann (15 ml). Til løsningen tilsettes 50% kaliumkarbonat (5 ml) under avkjøling med is og blandingen får stå ved 4°C i 40 min. De dannede krystaller samles ved filtrering, vaskes med kaldt vann og tørres i vakuum og gir tyrosinmetylester (2,55 g).

På den annen side oppløses N^α-t-butyloksykarbonyl-β-alanin (1,89 g) oppnådd i henhold til det foregående i vannfri tetrahydrofuran og oppløsningen avkjøles til -10°C. Til oppløsningen tilsettes sakte en t-butylamin (2,04 g) og etylklorformat (1,19 g) under omrøring. Etter 10 min. tilsettes en suspensjon av tyrosinmetylester (1,95 g) erholdt i forhold til det foregående i vannfri

tetrahydrofuran (20 ml). Blandingen omrøres i 30 min. ved -10°C og i $2\frac{1}{2}$ time ved romtemperatur og oppløsningsmidlet fjernes ved inndamping under redusert trykk. Den resulterende rest oppløses i etylacetat, vaskes først med N saltsyre, vann, 5% natriumhydrogenkarbonat og til slutt med vann og tørres over natriumsulfat. Etter fjernelse av løsningsmidlet ved avdamping under redusert trykk tilsettes eter til den erholdte rest for å utfelle krystaller. Etter henstand over natten samles de dannede krystaller ved filtrering og føres i vakuum og gir den ønskede dipeptidester (2,99 g). Omkrystallisering fra metanol/eter gir krystaller som smelter ved 141 til 142°C og har en optisk dreining på $[\alpha]_D^{23} = +8,2 \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,020$ i metanol).

Analyse beregnet for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 59,00; H, 7,15; N, 7,65.

Funnet: C, 59,03; H, 7,12; N, 7,63.

3) N^{α} -t-butylloksykarbonyl β -alanyl-tyrosinhydrazid (IV).

N^{α} -t-butylloksykarbonyl β -alanyl-tyrosinmetylester (2,56 g) oppløses i vannfri etanol (26 ml). Hydrazinhydrat (1,7 ml) tilsettes til løsningen og blandingen holdes ved romtemperatur i 5 timer og ved 4°C over natten. De dannede krystaller samles ved filtrering, vaskes med etanol og eter og tørres og gir det ønskede dipeptidhydrazid (2,54 g). Omkrystallisering fra varmt vann gir krystaller med smeltepunkt $213,5$ til 215°C med optisk dreining $[\alpha]_D^{23} = +3,60 \pm 0,6^{\circ}$ ($c = 0,978$ i 50% eddiksyre).

Analyse beregnet for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5$: C, 55,72; H, 7,15; N, 15,29.

Funnet: C, 55,74; H, 7,11; N, 15,30.

4) N^{α} -t-butylloksykarbonyl β -alanyl-tyrosyl-seryl-metioninmetylester (VI).

N^{α} -t-butylloksykarbonyl β -alanyl-tyrosinhydrazid (1,10 g) oppløses i kald N saltsyre (7,5 ml). Oppløsningen holdes ved omtrent -10°C og kald 2M natriumnitrit (3,6 ml) tilsettes til løsningen. Etter henstand av blandingen i 4 min. ekstraheres

det fremstilte azid med eter, vaskes med kald M natriumhydrogenkarbonat og tørres over vannfritt natriumsulfat. Etter fjernelse av løsningsmidlet ved avdamping under redusert trykk ved en badtemperatur på omtrent 10°C oppløses den erholdte rest i kald acetonitril. Til oppløsningen tilsettes serylmetioninmetylester (0,756 g) (fremstilt i henhold til den metode som er beskrevet i litteraturen: Bull.Chem.Soc.Japan., 39 1171 (1966) og blandingen settes bort i 48 timer. Løsningsmidlet fjernes ved avdamping under redusert trykk og resten oppløses ved tilsetning av etylacetat og deler av vann. Oppløsningen vaskes i rekkefølge med kald N saltsyre, vann, 5% natriumhydrogenkarbonat og vann og tørres over vannfritt natriumsulfat. Etter fjernelse av løsningsmidlet ved avdamping under redusert trykk oppsamles det resulterende gelatinøse produkt ved filtrering, vaskes med kald etylacetat og eter og tørres til å gi den ønskede tetrapeptidmetylester (1,20 g). Produktet renses ved fornyet utfelling fra etylacetat.

Smeltepunkt: $121,5$ til 123°C .

$[\alpha]_D^{23} = -13,0 \pm 0,6^{\circ}$ ($c = 0,997$ i metanol)

RF 0,53 (ved tynnskikt-kromatografering i løsningsmiddelsystemet metanol:eddiksyre = 15:85)

Analyse beregnet for $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$: C, 52,41; H, 6,90; N, 9,58; S, 5,48.

Funnet: C, 52,94; H, 6,85; N, 9,65; S, 5,48.

5) N^{α} -t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metioninhydrazid (VII).

N^{α} -t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metioninmetylester (0,97 g) oppløses i dimetylformamid (6 ml). Til oppløsningen tilsettes hydrazidhydrat (0,5 ml) og blandingen settes bort ved 4°C i omtrent 43 timer. Oppløsningen tilsettes etylacetat og danner et gelatinöst material som samles ved filtrering, vaskes med kald etylacetat og tørres og gir det ønskede tetrapeptidhydrazid (1,01 g). Omkrystallisering fra vann gir krystaller som smelter ved $186,5$ til 188°C og har optisk dreining på

$[\alpha]_D^{23} = -20,1 \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,346$ i 50% metanol).

Analyse beregnet for $C_{25}H_{40}O_8N_6S \cdot H_2O$: C, 49,82; H, 7,02; N, 13,94;
S, 5,32.

Funnet: C, 49,72; H, 7,05; N, 14,50; S, 5,15.

Fremstilling av γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycin (XV).

1) nitroarginyl-tryptofyl-glycinmetylesterformat (IX).

t-butylloksykarbonyl- N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycinmetylester (5,77 g) oppløses i maursyre (98 - 100%, 50 ml) og oppløsningen henses i $3\frac{1}{2}$ time. Maursyren fjernes ved avdamping ved en badtemperatur på 40 - 45°C og resten oppløses i vann. Oppløsningen vaskes med eter og lyofiliseres og gir det ønskede produkt (4,86 g) med smeltepunkt 107 til 111°C og med optisk dreining på $[\alpha]_D^{23} = +13,0 \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,062$ i metanol).

Analyse beregnet for $C_{20}H_{28}N_8O_6 \cdot HCOOH \cdot \frac{1}{2}H_2O$: C, 47,45; H, 5,88;
N, 21,08.

Funnet: C, 47,25; H, 6,03; N, 20,90.

2) t-butylloksykarbonyl-fenylalanyl- N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycinmetylester (X).

Denne forbindelse syntetiseres på nøyaktig samme måte som beskrevet i litteraturen: Bull.Chem.Soc.Japan, 38 1148 (1965) med unntagelse av bruken av det tripeptidesterformat som erholdt ovenfor i stedet for trifluoracetatet. Den ønskede forbindelse oppnås i et utbytte på 4,06 vektdeler ved å omsette N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycin-metylesterformat (4,81 vektdeler) med t-butylloksykarbonyl-fenylalanindicykloheksylaminsalt (4,42 vektdeler) i acetonitril ved hjelp av dicykloheksylkarbodiimidmetoden. Produktet smelter ved 176 til 177°C og har en optisk dreining på $[\alpha]_D^{23} = -20,4 \pm 2^\circ$ ($c = 2$ i metanol).

Analyse beregnet for $C_{34}H_{45}N_9O_9$: C, 56,42; H, 6,27; N, 17,42.

Funnet: C, 56,34; H, 6,22; N, 17,58.

3) Fenylalanyl- N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycinmetylesterformat (XI).

t-butylloksykarbonyl-fenylalanyl- N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycinmetylester (1,81 g) oppløses i maursyre (18 ml) og oppløsningen holdes ved romtemperatur i $3\frac{1}{2}$ time. Etter fjernelse av maursyren krystalliseres resten fra N-butanol. Det krystallinske produkt frafilteres, vaskes med eter og tørres i vakuum. Utbytte (1,71 g). Produktet smelter ved 124 til $125,5^\circ C$ og har en optisk dreining på $[\alpha]_D^{23} = -9,0 \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,977$ i metanol).

Analyse beregnet for $C_{29}H_{37}N_9O_7 \cdot HCOOH \cdot \frac{1}{2}H_2O$: C, 54,38; H, 6,28; N, 17,84.

Funnet: C, 53,00; H, 6,10; N, 17,79.

4) N^α, N^{Im} -dibenzylloksykarbonyl-histidyl-fenylalanyl- N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycinmetylester (XII).

Dette peptid oppnås på lignende måte ved fremgangsmåten beskrevet i Bull.Chem.Soc.Japan., 38 1148 (1965), med den unntagelse at det ovenfor beholdte tetrapeptidesterformat anvendes i stedet for det tilsvarende trifluoracetat. Dvs. at pentapeptidesteren fremstilles fra fenylalanyl- N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycinmetylesterformat (2,60 g) og N^α, N^{Im} -dibenzylloksykarbonyl-histidin p-nitrofenylester (1,91 vektdeler). Utbytte 2,70 g. Optisk dreining av produktet er $[\alpha]_D^{27} = -22,3 \pm 0,3^\circ$ ($c = 2,084$ i dimetylformamid).

Analyse beregnet for $C_{51}H_{56}N_{12}O_{12} \cdot H_2O$: C, 58,50; H, 5,58; N, 16,05.

Funnet: C, 58,63; H, 5,70; N, 15,89.

5) Histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycinmonoacetat (XIII)

N^α, N^{Im} -dibenzylloksykarbonyl-histidyl-fenylalanyl- N^G -nitro-arginyl-tryptofyl-glycinmetylester (1,44 g) hydrolyseres i 90% dioksan og

lyofiliseres fra eddiksyre til benzyloksykarbonylhistidyl-fenylalanyl-N^G-nitro-arginyl-tryptofyl-glycin (1,35 g) ved den fremgangsmåte som er beskrevet i Bull.Chem.Soc.,Japan, 38 1148 (1965).

Pentapeptidet (0,72 g) erholdt som ovenfor angitt og anisol (0,72 ml) oppløses i vannfritt hydrogenfluorid (7 til 8 ml) ved en kullsyre-is/acetonbadtemperatur og blandingen omrøres ved 0°C i 30 min. Etter fjernelse av hydrogenfluoridet ved avdamping tömes resten over natriumhydroksyd kuler over natten i vakuum. Resten oppløses i vann (20 ml) og oppløsningen vaskes grundig med etylacetat og føres så gjennom en liten kolonne av "Amberlite" CG-400 (acetatformen). Kolonnen vaskes med vannmengder. De vandige utløp kombineres og lyofiliseres. Utbytte (0,64 g, $\lambda_{0,1 \text{ N HCl}}^{\text{maks}} = 279 \text{ m}\mu (E_{1 \text{ cm}}^{1\%} 66,2), 288 \text{ m}\mu (E_{1 \text{ cm}}^{1\%} 53,5)$ og

$\lambda_{0,1 \text{ N NaOH}}^{\text{maks}} = 280 \text{ m}\mu (E_{1 \text{ cm}}^{1\%} 65,0), 288 \text{ m}\mu (E_{1 \text{ cm}}^{1\%} 54,5)$.

Papirkromatografering (n-butanol:eddiksyre:pyridin:vann = 30:6:20:24 volumdeler som oppløsningsmiddel) viser nærværet av en hovedkomponent ($R_f = 0,47$ til $0,53$) og to spormengder som alle var reaktive overfor ninhydrin, Pauly og Ehrlich reagenser. Bare hovedandelen er reaktiv overfor Sakaguchi reagens.

6) Benzyloksykarbonyl- γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycinmonoacetat (XIV).

En løsning av forbindelsen (XIII) (0,83 vektdeler) og trietylamin (0,28 ml) i 90% dimetylformamid (10 ml) omrøres ved 0°C og tilsettes benzyloksykarbonyl- γ -t-butyl-glutaminsyre p-nitrofenylester (0,46 g) og blandingen omrøres ved 4°C over natten. En ytterligere mengde (0,46 g) av den aktive ester innføres og blandingen holdes ved 4°C inntil pentapeptidet (XIII) ikke lenger kan påvises ved tynnskiktskromatografering. Reaksjonsblandingen tilsettes så dråpevis til iskold etylacetat (100 ml) og gir et gelatinöst bunnfall som frafiltrereres, vaskes med etylacetat og tørres i vakuum. Produktet utfelles igjen fra eddiksyre-vann og gir det ønskede heksapeptid. Utbyttet var 0,84 vektdeler, $[\alpha]_D^{23} = -26,6 \pm 0,5^\circ (c = 1,377 \text{ i } 50\% \text{ eddiksyre})$.

131170

Analyse beregnet for $C_{51}H_{64}N_{12}O_{11} \cdot CH_3COOH \cdot 7H_2O$: C, 52,86;
H, 6,74; N, 13,98.

Funnet: C, 52,73; H, 6,85; N, 13,92.

7) γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycinmonoacetat (XV).

Forbindelsen (XIV) (0,265 g) i 50% eddiksyre (10 ml) hydrogenolyseres i nærvær av palladiumsort i $2\frac{1}{2}$ time. Etter at katalysatoren er fjernet ved filtrering inndampes filtratet under redusert trykk ved en badtemperatur på 45 til 50°C. Resten lyofiliseres fra eddiksyre og tørres over natriumhydroksydkuler i vakuum. Utbytte var 0,22 g. Produktet oppfører seg som en enkelt komponent ved papirkromatografering (n-butanol:eddiksyre: vann = 4:1:2 volumdeler som oppløsningsmiddel).

Analyse beregnet for $C_{43}H_{58}N_{12}O_9 \cdot CH_3COOH \cdot 8H_2O$: C, 49,53; H, 7,21;
N, 15,40.

Funnet: C, 49,46; H, 6,77; N, 15,49.

Fremstilling av t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl- γ -t-butyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycin (XVI)

Til en oppløsning av VII (0,45 g) i 90% dimetylformamid (4,5 ml) som er blitt hurtig avkjølt i et isblandet saltbad tilsettes iskold N saltsyre (2,0 ml) og iskold M natriumnitrit (0,83 ml) og blandingen omrøres i 4 min. Iskold mettet natriumklorid (20 ml) og iskold etylacetat innføres så. Det vandige lag som fraskilles ekstraheres to ganger med etylacetat. De organiske oppløsninger kombineres, vaskes med kald 5% natriumbikarbonat, tørres over natriumsulfat og tilsettes til en løsning av XV (0,50 g) og trietylamin (0,21 ml) i dimetylformamid (15 ml) og blandingen inndampes ved en badtemperatur på 10 til 15°C under redusert trykk for å fjerne etylacetatet. Den resulterende klare oppløsning holdes ved 4°C over natten. En ytterligere mengde av azidet (fremstilt fra 0,23 g av VII som ovenfor beskrevet) innføres og reaksjonsblandingen holdes ved 4°C i ytterligere et døgn. Den

tilsettes så dråpevis til iskold etylacetat (200 ml) for å gi amorft bunnfall som frafiltreres, vaskes med etylacetat og tørres i vakuum med utbytte 0,69 g. Fornyet utfelling fra dimetylformamid-metanol (2:5) blir det rene dekaeptidderivat med optisk dreining på $[\alpha]_D^{23} = -19,4 \pm 0,7^\circ$ ($c = 0,882$ i dimetylformamid). Produktet oppfører seg som en enkelt komponent ($R_f = 0,54$ til $0,57$) med tynnskiktskromatografering (dimetylformamid:etylacetat:eddiksyre = 15:10:2 volumdelar som løsningsmiddel).

Analyse beregnet for $C_{68}H_{94}N_{16}O_{17}S \cdot 8H_2O$: C, 51,57; H, 7,00; N, 14,15; S, 2,02.

Funnet: C, 51,62; H, 6,66; N, 14,06; S, 2,64.

Fremstilling av β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-lysyl-lysyl-arginyl-argininamid (XX)

Til en oppløsning av forbindelsen XVI (0,37g) i dimetylformamid (10 ml) tilsettes iskold N saltsyre (0,25 ml) ved $0^\circ C$ og oppløsningen tilsettes med en gang til iskold etylacetat/eter (1:1), (200 ml). De resulterende utfellinger frafiltreres, vaskes med eter og tørres i vakuum med utbytte 0,36 g. Disse bunnfall ble oppløst i dimetylformamid (5 ml) og det tilsettes N-hydroksysuksinimid (0,115 g) og N,N'-dicykloheksylkarbodiimid (0,21 g) i tur og orden og blandingen får stå ved $4^\circ C$ over natten. Etter fjernelse av utskilte urinstoffer innføres filtratet i iskold etylacetat-eter (1:1, 200 ml). Utfellingene frafiltreres, vaskes med eter og tørres i vakuum og gir den aktive dekaeptidester med utbytte 0,39 g.

Triacetat av N^ϵ -t-butylloksykarbonyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl- N^ϵ -t-butylloksykarbonyl-lysyl- N^ϵ -t-butylloksykarbonyl-lysyl-arginyl-argininamid (0,23 g) oppløses i dimetylformamid (3 ml) og trietylamin (0,24 ml) tilsettes. Til dette tilsettes en oppløsning av den aktive dekaeptidester erholdt ovenfor (0,39 g) i dimetylformamid og reaksjonsblandingen (totalt volum ca. 5 ml) får stå ved $4^\circ C$ i 60 timer. Det rå beskyttede oktadekaeptid erholdes som et amorft faststoff når reaksjonsblandingen innføres.

131170

i kald etylacetat (100 ml) med utbytte 0,55 g.

Det beskyttede peptid erholdt ovenfor (0,55 g) oppløses for å fjerne beskyttelsen i 90% trifluoreddiksyre (6 ml) og oppløsningen holdes ved romtemperatur i 60 min. hvorefter oppløsningsmidlet fjernes med inndamping under redusert trykk. Resten oppløses i vann og oppløsningen føres gjennom en kolonne (2,2 x 7 cm) av "Amberlite" CG-400 (acetatformen). Kolonnen vaskes flere ganger med vann. De vandige løsninger kombineres og konsentreres til 10 til 15 ml under redusert trykk. Til konsentratet tilsettes M merkaptoetanol (1 ml) og blandingen inkuberes ved 37°C over natten og lyofiliseres. Det rå deblokkerte peptid (0,51 g) oppnådd på denne måte underkastes for rensing en kromatografering på en kolonne (2,7 x 12 cm) av karboksymetylcellulose (CMC, "Serva" 0,6 meq/g) under anvendelse av en ammoniumacetatbuffer (pH 6,8, 4000 volumdeler) med en lineær konsentrasjonsgradient på 0,05 til 0,4 M. Fraksjonene (15 ml/ prøveglass) tilsvarende en hovedtopp (prøveørene 166-245) kombineres og hovedandelen av løsningsmidler fjernes under redusert trykk. Resten lyofiliseres gjentatte ganger til konstant vekt og gir det delvis rensede oktadekapeptid med utbytte 0,22 g.

Produktet (0,2 g) kromatograferes for videre rensing på en kolonne (2,2 x 18 cm) av CMC ("Serva" 0,6 meq/g) under anvendelse av en ammoniumacetatbuffer (pH 6,8, 2000 ml) med en lineær konsentrasjonsgradient på 0,05 til 0,8 M. Fraksjonene (7,5 ml/prøverør) tilsvarende en hovedtopp (prøveørene 125 til 160) kombineres, konsentreres og lyofiliseres og gir det rene peptid, β -alanyl-tyrosyl-seryl-metionyl-glutamyl-histidyl-fenylalanyl-arginyl-tryptofyl-glycyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-lysyl-lysyl-arginyl-argininamid (0,17 g) $[\alpha]_D^{27} = -54,0 \pm 1,8^\circ$ ($c = 0,515$, 0,1 N eddiksyre), $\lambda_{0,1\text{ N NaOH}}^{1\%} = 280\text{ m}\mu$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} 23,0$), $\lambda_{0,1\text{ N HCl}}^{1\%} = 288,5\text{ m}\mu$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} 17,5$) og $\lambda_{0,1\text{ N NaOH}}^{1\%} = 281,5\text{ m}\mu$ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} 24,9$), 288 m μ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} 24,3$). Peptidet oppfører seg som en enkelt komponent overfor ninhydrin, Pauly-, Ehrlich-, Sakaguchi- og metionin-(PtI₆)"-reagenser ved papirkromatografering (n-butanol:eddiksyre:pyridin:vann = 30:6:20:24 som løsningsmiddel) og i papirelektroforese (600 V/36 cm i 2N eddiksyre). Aminosyreforholdene i syrehydrolysatet er følgende: Ser 0,75, Glu 0,90, Pro 0,91,

131170

Gly 1,89; Val 1,00, Met 0,96, Tyr 1,01, Phe 0,97, β -Ala 1,00, Lys 2,83, His 0,92, Arg 2,82, Trp 0,55, NH_3 1,42. Trp/Tyr-forholdet i intakt oktadekapeptid bestemmes spektrofotometrisk til 1,16.

Eksempel 2

(β -Ala¹)-ACTH(1-18) NH_2 acetat (5 g) oppløses i 40 mM sinkklorid (2,5 ml). Oppløsningen tilsettes en oppløsning (2,5 ml) av 40 mM dinatriumhydrogenfosfat inneholdende natriumklorid (45 g) for å fremstille en suspensjon av det ønskede kompleks.

Blandingen tilføres i hypofysektomiserte rotter ved intramuskulær injeksjon (5 μl /rotte). Etter to timer ble en mengde av 11-hydroksykortikosteroid i plasma bestemt å være 80 $\mu\text{g}/\text{dl}$. I motsetning hertil, ved tilførsel av et preparat oppnådd på samme måte, men med utelukkelse av sinkklorid, var mengden av 11-hydroksykortikosteroid 6 $\mu\text{g}/\text{dl}$.

Prøven ble gjennomført i henhold til den metode som er beskrevet i Endocrinol. Japonica., 13 180 (1966).

Eksempel 3

(β -Ala¹)-ACTH(1-18)- NH_2 -acetat (10 g) oppløses i destillert vann, (2 ml). Til oppløsningen tilsettes under omrøring en oppløsning av poly-L-aspartinsyre (20 g molekylvekt på omtrent 3.000) som er nøytralisert med 0,1 N natriumhydroksyd (3 ml) for bruken og det dannes på denne måte en suspensjon av et gitt bunnfall. Den ønskede suspensjon av komplekset oppnås ved ytterligere tilsetning til den ovenfor oppnådde suspensjon av en oppløsning (5 ml) ved pH 6,8 av M/15 dinatrium-hydrogenfosfat/dikaliumhydrogenfosfat inneholdende natriumklorid (90 g) preparatet tilføres i hypofysektomiserte rotter ved intramuskulær injeksjon (5 μl /rotte). To timer etter injeksjonen ble mengden av 11-hydroksykortiko-

131170

steroid i plasma bestemt å være 45 µg/dl, men den mengde som kunne påvises når et preparat uten poly-L-aspartinsyre fremstilt på samme måte ble anvendt, ble funnet å være 6 µg/dl.

Eksempel 4

(β-ala¹)-ACTH(1-18)-NH₂ acetat (5g) oppløses i destillert vann (1,5 ml). Til oppløsningen tilsettes en oppløsning (1 ml) av poly-L-glutaminsyre (5 g) med molekylvekt omtrent 1.500-2.000 som er blitt innstilt med 0,1 N natriumhydroksyd. Det dannes en suspensjon av det utfelte kompleks. Ved å tilsette en oppløsning av M/30 fosfatbuffer (pH 7,0) (2,5 ml) inneholdende natriumklorid (90 vektdeler) til suspensjonen oppnås den ønskede preparatform av komplekset.

Eksempel 5

(β-ala¹)-ACTH (1-18)-NH₂ acetat (5 g) oppløses i 100 mM sinkklorid (15 ml). På den annen side nøytraliseres poly-L-glutaminsyre (5 g) med molekylvekt 1.500 til 2.000 med 0,1 natriumhydroksyd (1 ml) og til oppløsningen tilsettes natriumklorid (45 g) og 40 mM dinatriumhydrogenfosfat (25 ml). Den således oppnådde oppløsning av okta-dekapeptidet og en oppløsning av polyglutaminsyren kombineres til å danne en suspensjon av det ønskede kompleks.

PATENTKRAV.

Analogifremgangsmåte for fremstilling av det nye, terapeutisk aktive okta-dekapeptid β-alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-lysyl-L-lysyl-L-arginyl-L-argininamid, ikke-giftige syreaddisjonssalter derav, eller komplekser derav med sink, polyglutaminsyre, polyaspartinsyre, kopoly-(glutamyl-tyrosin) eller blandinger av disse

k a r a k t e r i s e r t v e d at aminosyrene β-alanin, L-tyrosin, L-serin, L-metionin, L-glutaminsyre, L-histidin, L-fenylalanin, L-tryptofan, glycin, L-lysin, L-prolin, L-valin og L-arginin i den ønskede rekkefølge og/eller peptidbruddstykker som inne-

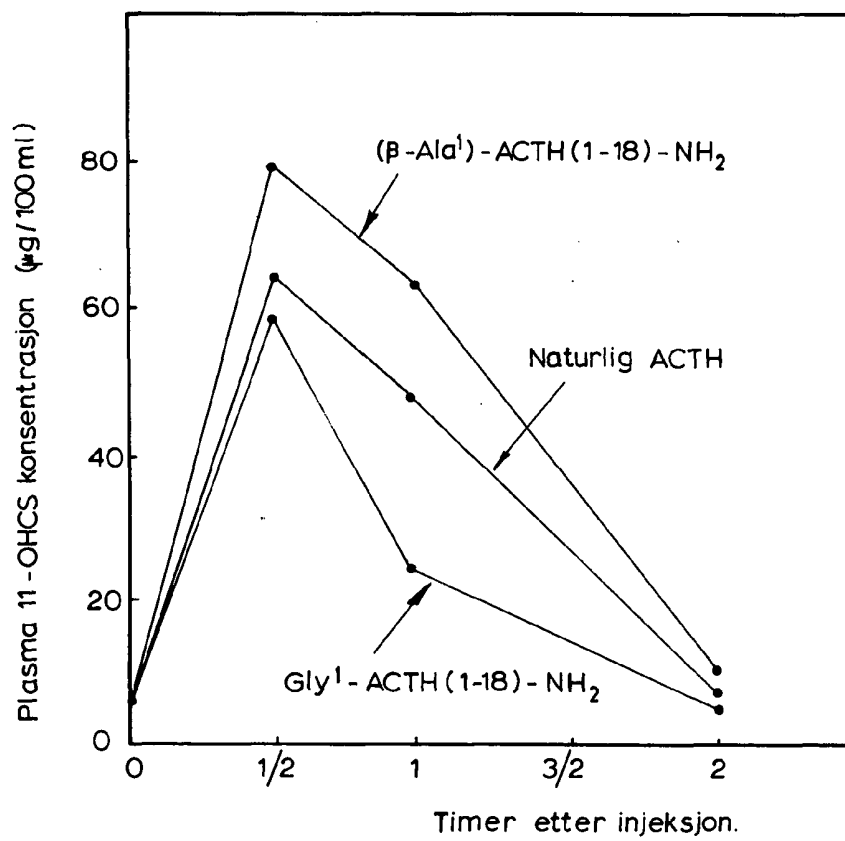
131170

holder disse aminosyrer i den ønskede rekkefølge, kondenseres til det angitte oktadekapeptid under anvendelse av innen peptid-kjemien kjente metoder, idet en endestående karboksylgruppe og/eller aminogruppe aktiveres før kobling og de øvrige reaktive grupper beskyttes intermediært, og det resulterende oktadekapeptid eventuelt overføres i saltene eller kompleksene på i og for seg kjent måte.

(56) Anførte publikasjoner: Ingen.

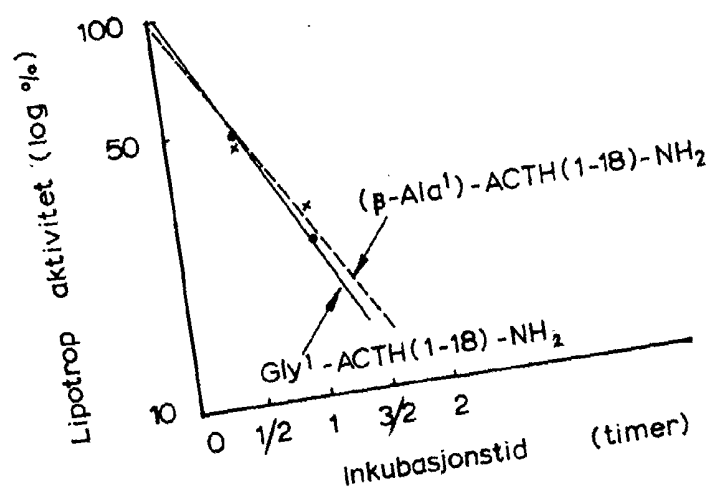
131170

FIG. 1



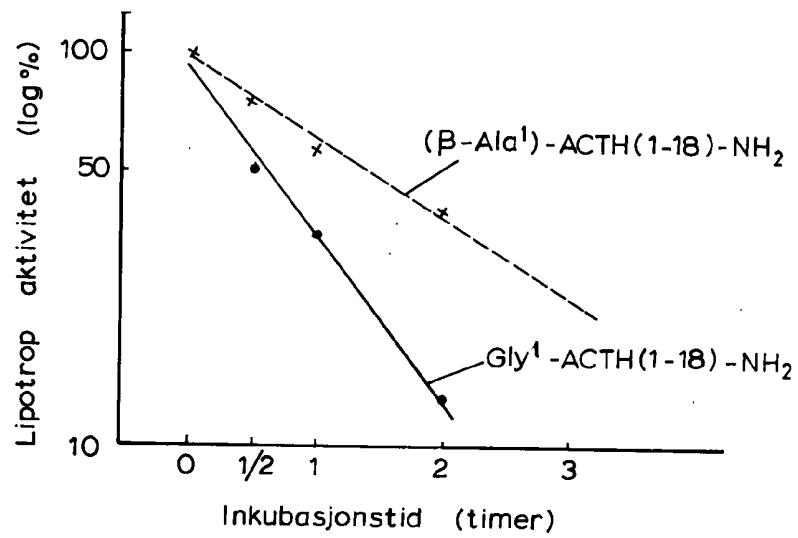
131170

FIG. 2



131170

FIG. 3



131170

FIG. 4

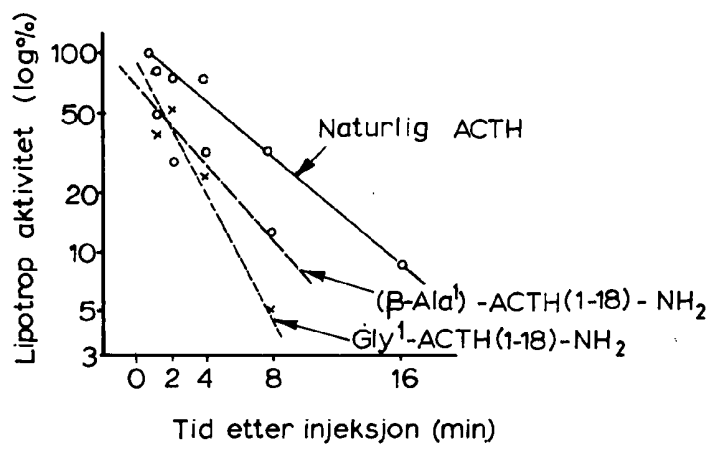
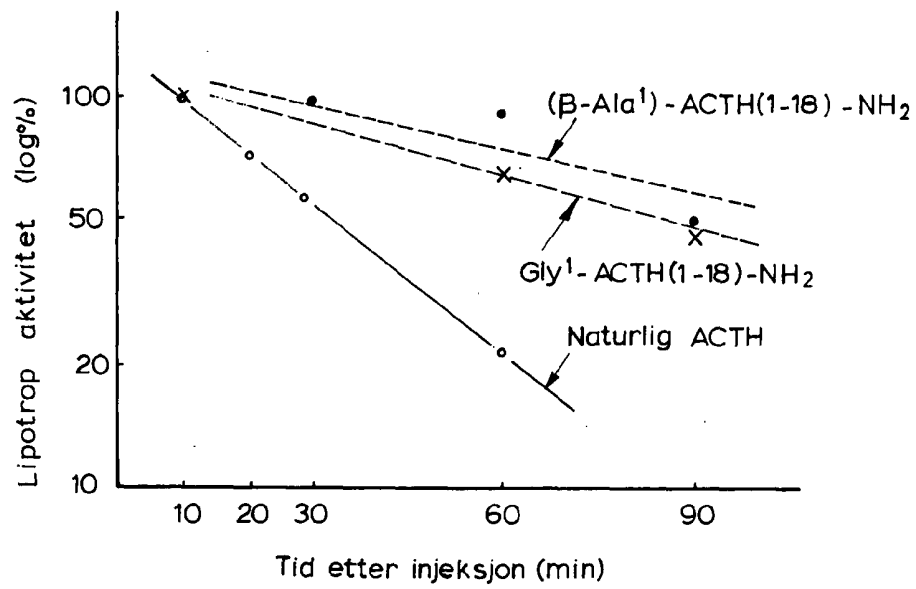


FIG. 5



131170

FIG. 6

