



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 148906 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

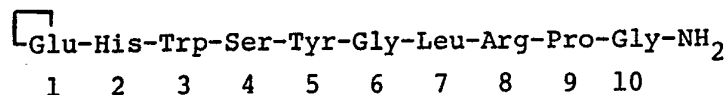
-
- (21) Patentansøgning nr.: 4396/83 (51) Int.Cl.⁴: C 07 K 7/20
(22) Indleveringsdag: 26 sep 1983
(24) Løbedag: 08 aug 1975
(41) Alm. tilgængelig: 26 sep 1983
(44) Fremlagt: 11 nov 1985
(86) International ansøgning nr.: –
(62) Stamansøgning nr.: 3618/75
(30) Prioritet: 09 aug 1974 DE 2438350
- (71) Ansøger: *HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Frankfurt/Main, DE.
(72) Opfinder: Wolfgang *Koenig; DE, Rolf *Gelger; DE, Juergen Kurt *Sandow; DE.

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co

(54) LH–RH–analoge nonapeptidderivater til diagnostisk anvendelse

DK 148906 B

Releasinghormonet LH-RH/FSH-RH, der udløser det luteotrope hormon (LH) og det follikelstimulerende hormon (FSH), med strukturen

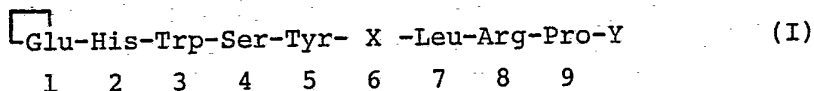


(Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1334 (1971)) er allerede blevet modificeret i mange positioner. Herved fandt man ud af, at aktiviteten blev hævet ved erstatning af Gly i positionen 6 med D-alanin (Biochemistry 12, 4616 (1973)) eller ved erstatning af Gly-NH₂ i positionen 10 med ethylamid, propylamid eller isopropylamid (J. Med. Chem. 16, 1144 (1973)). Kombineres disse to modifikationer, får man

analoge med endnu stærkere virkning (Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 335 (1974)). Det gode resultat af udbytningen af Gly med D-aminosyrer er første gang blevet vist ved insulin (Scientia Sinica XVI, 71-78 (1973)).

Erstatningen af glycin i positionen 6 med stærkere lipophile D-aminosyrer, f.eks. D-valin, D-leucin eller D-prolin, førte til analoge med ringe LH-RH-virkning (Abstracts of The Endocrine Society 55. Annual Meeting, 1973, side A 145). Det var derfor meget overraskende, at udbytningen af glycin med stærkt lipophile unaturlige D-aminosyrer, der indeholder en tertiær butylgruppe eller en benzyloxycarbonylgruppe som beskyttelsesgruppe, giver endnu stærkere virksomme analoge end de tilsvarende allerede kendte i 6-stillingen ubeskyttede analoge.

Opfindelsen angår hidtil ukendte LHRH-analoge nonapeptider til diagnostisk anvendelse, der er ejendommelig ved, at de har den almene formel



hvor X betyder D-Ser(Bu^t), D-Thr(Bu^t), D-Asp(OBU^t), D-Glu(OBU^t), D-Orn(Boc) eller D-Lys(Boc), og Y betyder en NH-alkylgruppe, i hvilken alkylgruppen indeholder 1-3 carbonatomer, eller betyder en NH-cyclopropylgruppe.

De her omhandlede nonapeptider fremstilles enten

- a) ved indenfor peptidkemien sædvanlig fragmentkondensation af peptidbrudstykker f.eks. efter kondensationsskemaet 1-3 + 4-10 eller 1-2 + 3-10 eller
- b) ved trinvis opbygning,

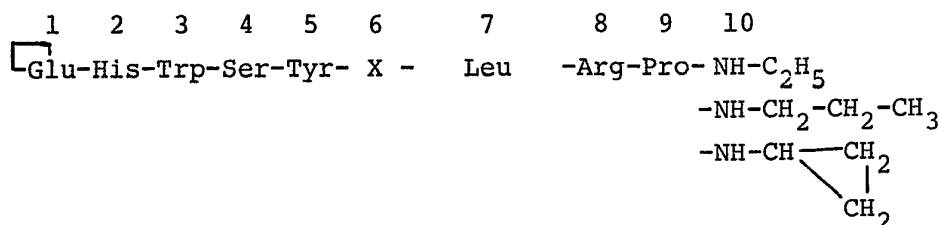
hvorved funktionelle grupper, der ikke skal indgå i reaktionen, eventuelt midlertidigt blokeres med afhydrogenerbare, eller i alkalisk eller svagt surt medium fraspaltelige beskyttelsesgrupper.

Særlig lange virkende LH-RH-analoge fås, når Y i den almene formel I betyder en NH-alkylgruppe med 2-3 carbonatomer.

Af større betydning er de her omhandlede forbindelser, i hvilke X betyder D-Ser(Bu^t), D-Thr(Bu^t), D-Glu-(OBU^t) eller D-Asp(OBU^t). Disse forbindelser er oralt virksomme. Oralt virksomme peptider med denne kædelængde har hidtil ikke været kendt.

Dette er særlig overraskende, da de tertiære butylethere og tertiære butylestere er ustabile i surt medium.

Som forbindelser med den her omhandlede udbytning i positionen 6 kommer f.eks. følgende LH-RH-analoge i betragtning:



Af de ovenfor nævnte forbindelser er sådanne af særlig betydning, i hvilke X betyder D-Ser(Bu^t), D-Glu(OBu^t) og D-Asp(OBu^t).

Ved syntesen af de her omhandlede forbindelser skal der kun anvendes metoder, ved hvilke de surt letfraspaltelige tertiære butylgrupper i positionen 6 ikke fraspaltes.

Ved fragmentkoblingen ifølge a) anvender man fortrinsvis den uden racemisering forløbende azidkobling eller DCC/1-hydroxybenzotriazol- eller DCC/3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazinmetoden. Man kan også anvende aktiverede estere af fragmenter.

For den trinvis kondensation af aminosyrer ifølge b) egner der sig særlig godt aktiverede estere af benzyloxycarbonylaminosyrer, f.eks. N-hydroxysuccinimidester eller 2,4,5-trichlorphenylester og 4-nitrophenylester. Aminolysen af de to sidstnævnte aktive estere kan særlig godt katalyseres af N-hydroxyforbindelser, der besidder omtrent den samme aciditet som eddikesyre, f.eks. 1-hydroxybenzotriazol.

Som intermediære aminobeskyttelsesgrupper anvendes der afhydrogenerbare grupper, f.eks. benzyloxycarbonylgruppen (= Z-gruppen) eller svagt surt fraspaltelige grupper, f.eks. 2-(p-diphenyl)-isopropylloxycarbonyl- eller 2-(3,5-dimethoxyphenyl)-isopropylloxycarbonylgruppen.

Guanidofunktionen i arginin kan forblive ubeskyttet eller kan blokeres af en nitrogruppe, der fraspaltes ved den efterfølgende hydrogenering. Den kan imidlertid også blokeres med surt fraspaltelige beskyttelsesgrupper, f.eks. carbobenzoxygruppen eller tosylgruppen, hvorved beskyttelsesgruppen imidlertid skal fraspaltes senest på tetrapeptidtrinnet. I tilfælde af nitro- eller tosylgrup-

pen lykkedes dette godt med flydende HF/anisol. Det samme gælder for en intermediær beskyttelse af amidgruppen ved hjælp af den surt fraspaltelige 4,4'-dimethoxybenzhydrylgruppe, der også senest skal fraspaltes på tetrapeptidtrinnet enten med trifluoreddikesyre/anisol eller sammen med en guanidobeskyttelsesgruppe og/eller surt fraspaltelig aminogruppe med HF/anisol.

De her omhandlede forbindelser udviser i forhold til 6-Gly-, men også overfor 6-D-Ala-analoge ved en ovulationsprøve og ved en ascorbinsyreformindselsesprøve en stærkere og længere varende virkning. Den overraskende orale virkning (dosis 0,01-0,2 mg/kg) af forbindelserne (X = D-Ser(Bu^t), D-Thr(Bu^t), D-Glu(OBu^t), D-Asp(OBu^t)) åbner for disse virksomme stoffer et bredere anvendelsesområde end det hidtil kun parenteralt eller nasalt indgivelige LH-RH. De her omhandlede forbindelser anvendes til fastlægnings af ovulationstidspunktet hos kvinder. Kort før det forventede ovulationstidspunkt kan en ovulation med sikkerhed udløses ved indgivelse af de nye forbindelser. Dette er af betydning ved familieplanlægning både efter Knaus-Ugino-metoden og ved den kunstige insemination.

De her omhandlede forbindelser kan opløst i en fysiologisk kogsaltopløsning anvendes intravenøst, intramuskulært eller subcutant, men kan også anvendes intranasalt i form af næsdråber eller næsespray og også oralt.

De forskellige anvendelsesmåders fortrinsvis anvendte doseringer er:

intravenøst	20 -	1000 ng/kg
subcutant	20 -	2000 ng/kg
intramuskulær	20 -	10 000 ng/kg
intranasalt	100 -	50 000 ng/kg
peroralt	10 000 -	200 000 ng/kg

Den biologiske aktivitet af de her omhandlede forbindelser i forhold til forbindelser ifølge kendt teknik hhv. peptider, der i position 6 har en D-aminosyre uden Bu^t eller Boc, er vist ved de nedenfor beskrevne forsøgsmetoder.

Materialer og metoder

Peptiderne, der er anført i tabellen nedenfor, afprøves ved to forskellige biologiske forsøgsmetoder:

Prøve 1: Fremkaldelse af ovulation med LH-RH eller LH-RH-analoge hos ikke-kønsmodne rotter, der i forvejen er behandlet med serum-gonadotropin fra drægtige hopper (PMSG) (hvilket er en forudsætning for, at der kan fremkaldes ovulation).

Prøve 2: Formindskelse af ovarie-ascorbinsyre hos pseudo-drægtige rotter, der i forvejen er behandlet med PMSG og humant chorion-gonadotropin. Baggrunden for denne prøve er, at ascorbinsyre er en co-faktor for steroid-biosyntesen og derved omdannes til dihydroascorbinsyre. Når der syntetiseres meget steroid, forbruges der også meget ascorbinsyre, hvorved koncentrationen deraf falder. LH-RH-Analoge intensiverer steroid-biosyntesen (via frigørelsen af LH og FSH) og sænker derfor ascorbinsyreniveauet.

LH-RH anvendes som sammenligningspræparat (rent syntetisk peptid) og har en aktivitet på 400 ng ved prøve 1 (minimal virksom dosis defineret som ED₂₅) og 600 ng ved prøve 2 (ED₅₀). Resultaterne i tabellen viser de relative aktiviteter i forhold til LH-RH, idet aktiviteten af LH-RH er sat til 1. Alle peptider prøves ved to eller flere dosisniveauer.

Tabel

position 6	position 10	Prøve 1	Prøve 2
LHRH		1	1
Her omhandlede forb.:			
D-Ser (Bu ^t)	ethylamin	133	130-150
D-Lys (Boc)	"	45	92
D-Glu (OBu ^t)	"	40	79
D-Asp (OBu ^t)	"	47	40
D-Ser (Bu ^t)	cyclopropylamin	40	65
Kendte eller beslægtede forb.:			
D-Lys (Ref.A ⁺)	ethylamin	(20)	(50)
D-Ala (Ref.R ⁺)	"	44	38
D-Ser	"	20	21
D-Glu	"	12	28
D-Asp	"	(ikke afprøvet)	8

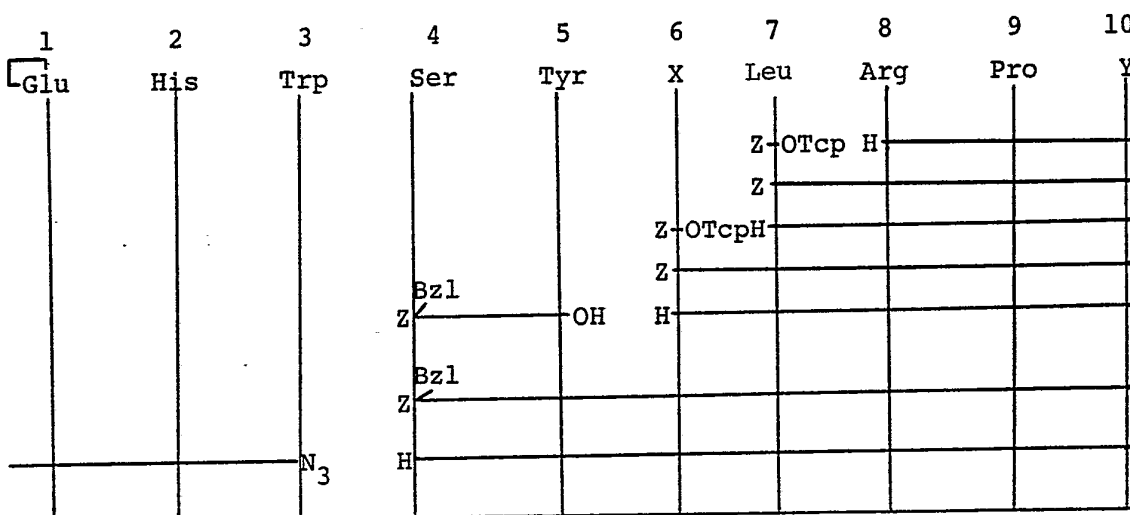
- +) Ref.A = US-patent nr. 3.896.104 (tilhører ikke kendt teknik)
 Ref.R = Biochem. and Biophys. Res. Comm. 57,
 1248 - 1256 (1974).

Resultater

Det viser sig, at peptider, der er beskyttet med tert.-butylholdige beskyttelsesgrupper i sidekæden af en D-aminosyre i position 6, alle er mere aktive end de tilsvarende ikke-beskyttede forbindelser eller beslægtede LH-RH-forbindelser, der har en D-aminosyre i position 6 og ethylamin i position 10.

Fremstillingen af de her omhandlede forbindelser med formlen I kan illustreres på følgende måde, når der er tale om fremstillingsvariant a) og kondensation efter skemaet 1-3 + 4-10:

Reaktionsskema:

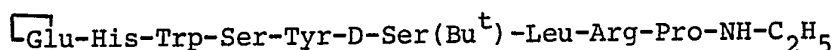


Y = NH-C₂H₅ (eksempel 1 og 2)

Y = NH-Cyclopropyl (eksempel 3)

Forkortelser:

Bzl	Benzyl
Boc	Tert.butylloxycarbonyl
Bu ^t	Tert.butyl
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
$\overline{\text{Glu}}$	Pyroglutaminsyre
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Mbh	4,4'-Dimethoxybenzhydrol
OBu ^t	Tert.butylester
ONb	p-Nitrobenzylester
ONSu	N-Hydroxysuccinimidester
OTcp	2,4,5-Trichlorphenylester
OOBt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazinester
Z	Benzyloxycarbonyl

Eksempel 1 (analogt med reaktionsskemaet)a) Z-Arg(Z₂)-Pro-NH-C₂H₅

Til en opløsning af 8,9 g (50 mmol) H-Pro-NH-C₂H₅·HCl, 28,9 g (50 mmol) Z-Arg(Z₂)-OH og 6,75 g (50 mmol) HOBt i 150 ml methylenchlorid sætter man ved 0°C 6,5 ml N-ethylmorpholin og 11 g DCC, og der omrøres i 1 time ved 0°C og henstilles natten over ved stuetemperatur. Bundfaldet fraskilles ved sugning, og filtratet koncentrerer. Remanensen fordeles mellem eddikeester og vand. Eddikeesterfasen udrystes efter hinanden med en mættet natriumhydrogencarbonatopløsning, 2N svovlsyre, en mættet natriumhydrogencarbonatopløsning og med vand, tørres over natriumsulfat og koncentrerer. Remanensen opløses i isopropanol. Herfra fældes en olie med petroleumsether, hvilken olie krystalliserer i løbet af natten. Udbytte 27,8 g (80%), smp. 82-85°C $[\alpha]_D^{22} = -30,0^\circ$ (c=1, methanol).

b) H-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl

39,7 g (56,7 mmol) Z-Arg(Z₂)-Pro-NH-C₂H₅ opløses i 200 ml methanol. Hertil sættes en spatelspids Pd/BaSO₄-katalysator, og der hydrogeneres, idet man under omrøring leder hydrogen gennem opløsningen. pH-værdien af opløsningen holdes ved hjælp af en autotitrator ved tilsætning af 1N methanolisk saltsyre på 4,5. Katalysatoren fraskilles ved sugning efter endt hydrogenering, og filtra-

tet koncentrerer. Remanensen udrives med ether og fraskilles ved sugning. Udbytte 17,9 g amorft stof (85%), $[\alpha]_D^{20} = -26,0^\circ$ (c=1, methanol)

c) Z-Ser-Tyr(Bzl)-OH

Til en suspension af 5,52 g (20 mmol) H-Tyr(Bzl)-OH i 60 ml dimethylacetamid sættes 7,68 g Z-Ser-OObt, og der omrøres i 6 timer ved stuetemperatur. Der fraskilles ved sugning fra uopløste bestanddele, og til det til 0°C afkølede filtrat sættes 300 ml vand. Bundfaldet fraskilles ved sugning, vaskes med dimethylacetat/vand-blanding (1:10) og vand og sammenrøres med 1N svovlsyre. Nu fraskilles der igen ved sugning og vaskes med vand og tørres. Der omkrystalliseres fra eddikeester/petroleumsether. Udbytte 7,35 g (75%), smp. 166°C , $[\alpha]_D^{20} = 20,9^\circ$ (c=1, methanol).

d) Z-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅

Til en opløsning af 11,2 g (30 mmol) H-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl i 50 ml dimethylformamid sættes ved 0° 7,8 ml N-ethylmorpholin og 8,25 g Z-Leu-ONSu. Blandingen henstilles natten over ved stuetemperatur og koncentrerer, og remanensen udrives en gang med eddikesyreester og en gang med ether. Opløsningsmidlet afdekanteres, og olien tørres i højvakuum. Remanensen (20,0 g) opløses i methanol og hydrogeneres katalytisk analogt med eksempel lb. Remanensen udrives med ether og tørres i højvakuum. Der fås 16,1 g amorft H-Leu-Arg-Pro-NHC₂H₅·2HCl, der er forurenat af salte (14,5 g = 100% henført til H-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl). 2,45 g af dette stof opløses sammen med 675 mg HOBT, 1,3 ml N-ethylmorpholin og 2,4 g Z-D-Ser(Bu^t)-OTcp i 20 ml dimethylformamid. Blandingen henstilles natten over ved stuetemperatur og koncentrerer den efterfølgende dag. Remanensen udrives to gange med en mættet natriumhydrocarbonatopløsning, opløses i methylenchlorid, tørres over natriumsulfat og koncentrerer, og remanensen sammenrives med ether. Udbytte 2,3 g (71% henført til H-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl), smp. 85-116°C.

e) H-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2 HCl

2,3 g (3,33 mmol) Z-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅ opløses i methanol og hydrogeneres katalytisk analogt med eksempel lb. Remanensen udrives med ether og tørres i højvakuum. Udbytte 1,93 g

amorft materiale (93%).

Ovennævnte 1,95 g (3,1 mmol) H-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl suspenderes sammen med 1,53 g (3,1 mmol) Z-Ser-Tyr(Bzl)-OH, 420 mg HOBt og 0,8 ml N-ethylmorpholin i 7 ml dimethylformamid. Ved 0°C tilsættes 680 mg DCC, og blandingen omrøres i 1 time ved 0°C og henstilles natten over ved stuetemperatur. Bundfaldet fraskilles ved sugning den påfølgende dag, og filtratet koncentrerer. Remanensen udrives to gange med en mættet natriumhydrogencarbonatopløsning og opløses i methylenchlorid, og opløsningen tørres over natriumsulfat og koncentrerer. Remanensen udrives med ether og frasuges. Der fås 2,65 g (= 2,57 mmol Z-Ser-Tyr(Bzl)-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅ af et amorft stof, der hydrogeneres katalytisk analogt med eksempel lb. Remanensen udrives med ether og tørres i højvakuum.

Udbytte 2,2 g amorf H-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl (= 2,5 mmol = 75% henført til Z-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅).

Til en analytisk prøve renses 1,3 g på den i det følgende beskrevne fordelingschromatografi-søjle. Opbygning af søjlen: 400 ml iseddike, 800 ml n-butanol og 4 liter vand udrystes. 300 ml af den øvre fase sammenrøres med 204 g "Sephadex" LH 20[®]. Herved opsuges det samlede opløsningsmiddel. Den således forbehandlede søjlefyldning suspenderes i en tilsvarende mængde af den underste fase. Der opkvædes i 3 timer, og søjlen fyldes (1 m x 4 cm). Der elueres med den underste fase. Udbyttet af chromatografisk rent stof er 562 mg. $[\alpha]_D^{22} = -43,9^\circ$ (c=1, i methanol).

f) L-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅-diacetat

Til en opløsning af 500 mg L-Glu-His-Trp-NH-NH₂ i 6 ml dimethylformamid sættes ved -30°C 0,66 ml af en 6,05 N HCl/dioxanopløsning og 1,2 ml af en 10%'s tertiær butylnitritopløsning i absolut dioxan. Der omrøres i 20 minutter ved -10°C og tilsættes ved -40°C 877,8 mg rå H-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl og 0,78 ml N-ethylmorpholin. Blandingens henstilles natten over i et kølerum ved 4°C og koncentrerer, og remanensen udrives med ether. Stoffet opløses i vand og chromatograferes over "Dowex"[®] 1x2 (acetatform). Eluatet koncentrerer og renses over en carboxymethylcellulosesøjle (90 x 1,5 cm), der er indstillet til ligevægt med 0,002 M NH₄-acetatopløsning. Stoffet tilsættes opløst i den 0,002 molære ammonium-

acetatopløsning. Der elueres med en 0,002 molær ammoniumacetatopløsning, der pålægges en gradient af 0,01M NH_4 -acetatopløsning (blandingsvolumen 250 ml).

De fraktioner, der indeholder det ønskede peptid, frysetørres to gange. Udbyttet er 401 mg chromatografisk rent stof. Indholdet af peptidbase er ifølge UV-spektret 76% (udbytte 25%).

$[\alpha]_D^{20} = -40,4^\circ$ ($c=1$, i dimethylacetamid).

g) \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅-diacetat

(som sammenligningsstof)

200 mg \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅-diacetat opløses sammen med 0,1 ml mercaptoethanol i 2 ml trifluoreddikesyre. Blandingen henstilles i 1 time ved stuetemperatur og koncentrerer, og remanensen udrives med ether. Stoffet fraskilles ved sugning og vaskes med ether, opløses i vand og chromatograferes over Dowex 1x2 (acetatform). Eluatet koncentrerer, og remanensen renses analogt med eksempel 1e over "Sephadex" LH 20. Udbyttet er 120 mg. Indholdet af peptidbase er ifølge UV-spektret 77,5%. $[\alpha]_D^{20} = -43,7^\circ$ ($c=1$, H₂O)

Eksempel 2 (analogt med reaktionsskemaet

\square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Glu(OBu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅

a) Z-D-Glu-(OBu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅

2,45 g med salte forurennet H-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl omsættes analogt med eksempel 1d med 2,6 g Z-D-Glu(OBu^t)-OTcp, 675 mg HOBt og 1,3 ml N-ethylmorpholin i 20 ml dimethylformamid. Udbytte 2,75 g (81% henført til H-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl), smp. 83-100°C

b) H-Ser-Tyr-D-Glu(OBu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl

1,85 g (2,53 mmol) Z-D-Glu(OBu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅ hydrogeneres katalytisk analogt med eksempel 1b i methanol. Remanensen udrives med ether og frasuges. Udbyttet er 1,7 g (99,5%).

Ovennævnte 1,7 g (2,5 mmol) H-D-Glu(OBu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl omsættes analogt med eksempel 1e med 1,23 g Z-Ser-Tyr-(Bzl)-OH, 340 mg HOBt, 0,65 ml N-ethylmorpholin og 550 mg DCC i 5 ml dimethylformamid. Udbytte 2,8 g let forurennet Z-Ser-Tyr(Bzl)-

-D-Glu(OBu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅, der hydrogeneres katalytisk analogt med eksempel 1b i methanol. Råstoffet renses analogt med eksempel 2e ved fordelingschromatografi. Udbyttet er 1108 g chromatografisk ensartet produkt (47% henført til Z-D-Glu(OBu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅). $[\alpha]_D^{22} = -42,3^\circ$ (c=1, i methanol).

c) L-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Glu(OBu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅-diacetat

Analogt med eksempel 1f omsættes 500 mg L-Glu-His-Trp-NH-NH₂ med 920 mg (1 mmol) H-Ser-Tyr-D-Glu(OBu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅·2HCl og renses chromatografisk. Udbytte 491,5 mg chromatografisk rent materiale. Indholdet af peptidbasen er ifølge UV-spektret 74% (udbytte 30%).

$[\alpha]_D^{22} = -31,3^\circ$ (c=1, dimethylacetamid)

d) L-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Glu-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅-diacetat

(som sammenligningsstof)

190 mg L-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Glu(OBu^t)-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅-diacetat omsættes og renses analogt med eksempel 1g. Udbytte 148,9 mg. Indholdet af peptidbasen er ifølge UV-spektret 85%. $[\alpha]_D^{22} = -47,8^\circ$ (c=1, i H₂O).

Eksempel 3 (analogt med reaktionsskemaet

L-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid

a) Z-Pro-cyclopropylamid

Til en opløsning af 25 g (0,1 mol) Z-prolin, 13,5 g (0,1 mol) HOBT og 5,71 g (0,1 mol) cyclopropylamin i 200 ml absolut tetrahydrofuran sættes ved 0°C 22 g DCC, opløst i 50 ml kold absolut tetrahydrofuran. Blandingen omrøres i 1 time ved 0°C og i 3 timer ved stuetemperatur. Bundfaldet fraskilles ved sugning, og filtratet koncentrerer. Den olieagtige remanens opløses i eddikeester og udrystes efter hinanden med en mættet natriumhydrogencarbonatopløsning, 2N saltsyre, en mættet natriumhydrogencarbonatopløsning og vand, tørres over natriumsulfat og koncentrerer. Remanensen udrydes med petroleumsether og frasuges. Til rensning omkrystalliseres der fra eddikeester/petroleumsether. Udbyttet er 23 g (= 80%). Smp. 120-123°C, $[\alpha]_D^{24} = -45,5^\circ$ (c=1, i methanol)

b) H-Pro-cyclopropylamid·HCl

Analogt med eksempel lb hydrogeneres katalytisk 19 g Z-Pro-cyclopropylamid i methanol. Remanensen udrives med ether. Udbyttet er 11 g (88%) og smeltepunktet er 169-173°C.

c) Z-Arg(Z₂)-Pro-cyclopropylamid

Til en opløsning af 28,85 g (50 mmol) Z-Arg(Z₂)-OH, 9,5 g (50 mmol) H-Pro-cyclopropylamid, HCl og 6,75 g (50 mmol) HOBt i 100 ml methylenchlorid og 25 ml dimethylformamid sættes 6,5 ml N-ethylmorpholin og ved 0°C en opløsning af 11 g DCC i lidt methylenchlorid. Blandingen henstilles i 1 time ved 0°C og natten over ved stuetemperatur. Bundfaldet fraskilles ved sugning, og filtratet koncentrerer. Remanensen optages i eddikeester og vaskes med vand, en natriumhydrogencarbonatopløsning, 1N saltsyre og en natriumhydrogencarbonatopløsning, tørres med natriumsulfat og koncentrerer. Remanensen krystalliserer fra eddikeester/petroleums-ether. Råstoffet (26,3 g) renses chromatografisk med en 250 g kiselgelsøjle i methylenchlorid/acetone 9:1 og 8:2. Udbyttet er 22 g (62%), og smeltepunktet er 171°C. $[\alpha]_D^{21} = -33,0^\circ$ (c=1, i methanol).

d) H-Arg-Pro-cyclopropylamid·2HCl

22 g (30,9 mmol) Z-Arg(Z₂)-Pro-cyclopropylamid hydrogeneres katalytisk i methanol analogt med eksempel lb. Remanensen tørres i højvakuum. Der fås 11 g (89%) af et amorft stof.

e) Z-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid

Til en opløsning af 3,83 g (10 mmol) H-Arg-Pro-cyclopropylamid·2HCl i 20 ml dimethylformamid sættes ved 0°C 2,6 ml N-ethylmorpholin og 2,75 g Z-Leu-ONSu. Blandingen henstilles natten over ved stuetemperatur og koncentrerer, og remanensen sammenrives en gang med eddikeester og en gang med ether. Opløsningsmidlet afdekkanterer, og olien tørres i højvakuum. Remanensen opløses i methanol og hydrogeneres katalytisk analogt med eksempel lb. Remanensen sammenrives med ether og tørres i højvakuum. Der dannes 5,45 g amorf H-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid·2HCl, der er forurennet af salt (4,96 = 100% henført til H-Arg-Pro-cyclopropylamid·2HCl). Det samlede stof opløses sammen med 1,35 g HOBt, 2,6 ml N-ethylmorpholin og 4,8 g Z-D-Ser(Bu^t)-OTcp i 20 ml dimethylformamid. Blandingen henstilles i 2 timer og koncentrerer, og remanensen sammen-

rives to gange med en mættet natriumhydrogencarbonatopløsning, opløses i methylenchlorid, tørres over natriumsulfat og koncentrerer, og remanensen sammenrives to gange med en mættet natriumhydrogencarbonatopløsning, opløses i methylenchlorid, tørres over natriumsulfat, koncentrerer og remanensen sammenrives med ether. Udbyttet er 4,55 g (65% henført til H-Arg-Pro-cyclopropylamid·2HCl). Stoffet er amorft og videreforarbejdes uden yderligere rensning.

f) H-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid·2HCl

3,5 g (5 mmol) Z-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid hydrogeneres katalytisk i methanol analogt med eksempel lb. Remanensen sammenrives med ether og tørres i højvakuum. Udbyttet er 3 g (94%) af et amorft materiale.

De ovennævnte 3 g (4,7 mmol) H-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid·2HCl opløses sammen med 2,32 g (4,7 mmol) Z-Ser-Tyr(Bzl)-OH, 635 mg HOBt og 1,22 ml N-ethylmorpholin i 10 ml dimethylformamid. Ved 0°C tilsættes 1,04 g DCC, og blandingen henstilles i 1 time ved 0°C og natten over ved stuetemperatur. Bundfaldet fraskilles den følgende dag ved sugning, og filtratet koncentrerer. Remanensen udrives to gange med en mættet natriumhydrogencarbonatopløsning, opløses i methylenchlorid, og opløsningen tørres over natriumsulfat og koncentrerer. Remanensen udrives med ether og frasuges. Der fås 3,5 g (71%) Z-Ser-Tyr(Bzl)-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid, der hydrogeneres katalytisk analogt med eksempel lb. Remanensen udrives med ether og tørres i højvakuum. Udbyttet er 2,92 g (= 70% henført til Z-Ser-Tyr(Bzl)-OH). Det rå stof renses som beskrevet i eksempel lb chromatografisk med Sephadex LH 20. Udbyttet af et chromatografisk rent stof er 1,4 g.

$[\alpha]_D^{22} = -44,2^\circ$ (c=1, i methanol).

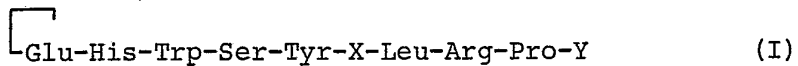
g) [Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid-diacetat

Analogt med eksempel lf omsættes 500 mg [Glu-His-Trp-NH-NH₂ med 890 mg H-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-cyclopropylamid·2HCl, oparbejdes og renses. Udbyttet er 420 mg chromatografisk rent stof. Indholdet af peptidbase er ifølge UV-spektret 77% (udbytte 32%).

$[\alpha]_D^{20} = -40,8^\circ$ (c=1, i dimethylacetamid).

P A T E N T K R A V.

LH-RH-analoge nonapeptidderivater til diagnostisk anvendelse, k e n d e t e g n e t ved, at de har den almene formel



hvor X betyder D-Ser(Bu^t), D-Thr(Bu^t), D-Asp(OBu^t), D-Glu(OBu^t), D-Orn(Boc) eller D-Lys(Boc), og Y betyder en NH-alkylgruppe, i hvilken alkylgruppen indeholder 1-3 carbonatomer, eller betyder en NH-cyclopropylgruppe.

Fremdragne publikationer:
