

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **150618 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: **0763/78**

(51) Int.Cl.⁴: **C 07 K 7/26**

(22) Indleveringsdag: **21 feb 1978**

(41) Alm. tilgængelig: **23 aug 1978**

(44) Fremlagt: **21 apr 1987**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **22 feb 1977 US 770953**

17 mar 1977 US 778517

06 sep 1977 US 830930

27 dec 1977 US 864173

29 sep 1977 GB 40471/77

(71) Ansøger: ***AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION; New York, US.**

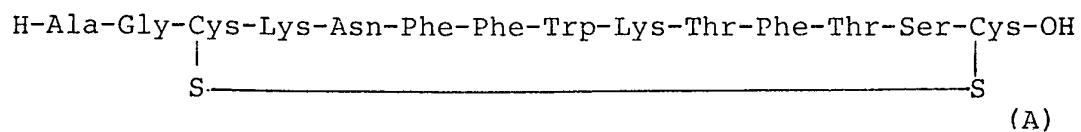
(72) Opfinder: **Dimitrios *Sarantakis; US.**

(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co**

(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af somatostatinanaloge eller farmaceutisk acceptable salte deraf**

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte somatostatinanaloge eller farmaceutisk acceptable salte deraf.

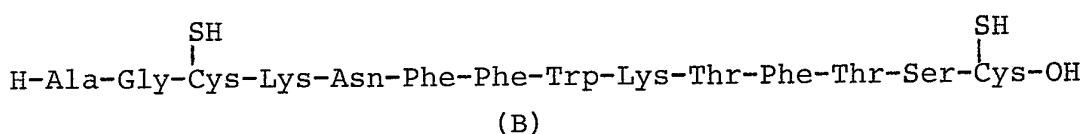
Det er blevet påvist, jf. Brazeau et al., Science, 179, 77 (1973), at den cycliske somatotropin-frigørelsesinhiberingsfaktor (SRIF), kendt som somatostatin, har nedenstående struktur



hvor alle aminosyrerne har "naturlig" eller L-konfiguration.

Adskillige metoder til fremstilling af somatostatin er beskrevet i litteraturen indbefattende faststoffasemetoden ifølge Rivier, J. Am. Chem. Soc., 96, 2986 (1974), og opløsningsmetoderne ifølge Sarantakis et al., Biochemical Biophysical Research Communications, 54, 234, (1973) og Immer et al., Helv. Chim. Acta., 57, 730 (1974), og der forskes meget inden for peptidområdet med henblik på at forbedre somatostatins farmakologiske virkning ved syntetisk modifikation af dets struktur.

Den reducerede form (åben kædeform) af somatostatin (RS) er det lineære tetradecapeptid med formlen



Den reducerede form (B) er blevet fremstillet ved totalsyntese, jf. Rivier et al., C.R. Acad. Sci. Ser. p. Sci. Natur (Paris), 276, 2737 (1973) og Sarantakis and McKinley, Biochem. and Biophys. Res. Communications, 54, 234 (1973), og denne form (B) kan omdannes til somatostatin (A) ved oxidation, hvorved der dannes en tværbinding imellem de to sulfhydrylgrupper i de to cysteinylaminosyrerester i tetradecapeptidet.

Mange polypeptider, som kan anses for at være strukturelle modifikationer af somatostatin, kan fremstilles syntetisk og er beskrevet i den kemiske litteratur. Sådanne polypeptider har visse strukturelle træk til fælles med somatostatin og adskiller sig fra somatostatin ved, at specifikke aminosyrerester eller funktionelle grupper, som oprindeligt var til stede i somatostatinmolekylet, enten mangler eller er erstattet af andre aminosyrerester eller funktionelle grupper.

Således angår dansk patentansøgning nr. 3515/76 såvel som en tilsvarende artikel i Biochemical and Biophysical Res. Commun. bind 65, nr. 2 (1975), side 746-751, D-Trp⁸-Somatostatin og dens virkningsforøgelse i forhold til somatostatin under forskellige afprøvningsbetingelser, navnlig i henseende til modstandsdygtighed mod enzymatisk nedbrydning.

Dansk patentansøgning nr. 885/76 angår en bred mangfoldighed af N-terminerede og C-terminerede modifikationer af somatostatin og giver ikke udtryk for videre kritiske forhold, for så vidt angår strukturen i disse endestillinger.

Det har dog efterhånden vist sig, at mange polypeptider, som er endog særdeles nærbeslægtede med somatostatin i strukturel henseende, kan være fuldstændig blottet for somatostatin-agtig aktivitet, se således Rivier et al., Peptides 1976, hvor dette punkt specielt illustreres i tabel III på side 439-440, hvoraf det klart fremgår, at selv meget små ændringer i struktur hyppigt resulterer i udtalte forskelle med hensyn til aktivitet. Dette gælder f.eks. for en forbindelse ($[\text{Asp}^5]\text{-SS}$), hvori den hydrofobe amidgruppe Asn i somatostatin-stilling er ændret til den hydrofile frie carboxylsyre Asp. Det ses, at denne ændring resulterer i et næsten fuldstændigt tab af aktivitet.

Dansk patentansøgning nr. 1404/75 beskriver eventuelle modifikationer af somatostatin med ornithin i 4- og/eller 9-stillingen og med alanin i 5-stillingen. Ud fra det, som er anført i beskrivelsen til sidstnævnte danske patentansøgning, må det konkluderes, at en hvilken som helst ændring i aktivitet set i forhold til somatostatin må hidrøre fra modifikationen ved molekylets N-terminale stilling, fordi aminosyrerne i 4-, 5- og 9-stillingerne kan være de samme som i somatostatin. I hvert fald anføres det på side 4 i det tilsvarende tyske patentskrift, at peptiderne har nogenlunde samme aktivitetsspektrum som naturligt somatostatin, omend de er kraftigere virkende og har den fordel, at virkningen holder sig længere, idet kun 20-60 vægtprocent er nødvendigt for at opnå samme biologiske aktivitet som med det naturlige peptid. Hvorledes kraften står i forbindelse med virkningens varighed, fremgår dog ikke tydeligt.

Den foreliggende opfindelse bygger nu på, at visse hidtil ukendte, syntetiske polypeptider, som kan anses for at være en strukturel modifikation af somatostatin, men afviger fra somatostatin i følgende henseender:

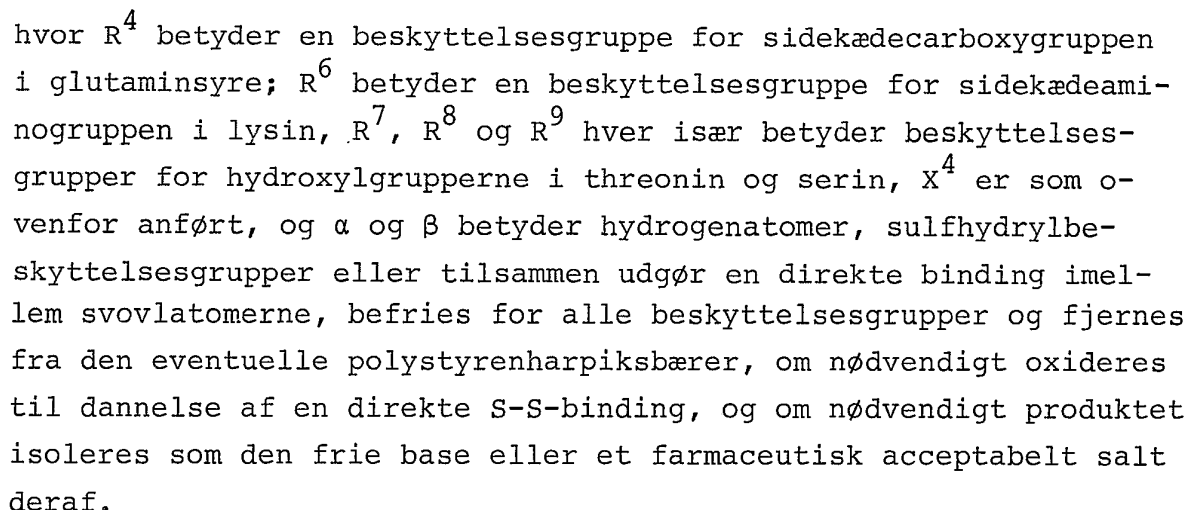
- (a) $\text{Ala}^1\text{-Gly}^2$ -segmentet er fraværende,
- (b) Lys^4 -resten er erstattet af Arg eller His,
- (c) Asn^5 -resten er erstattet af His eller Glu og
- (d) Trp^8 -resten er erstattet af D-trp,

har vist sig at være biologisk aktive på en helt særegen måde ved selektivt at sænke niveauet af såvel væksthormon som glucagon i blodet uden at påvirke dets insulinniveau i væsentlig grad, når de anvendes i afpassede doser. Hertil kommer, at disse nye somatostatinanaloge udviser overraskende lang virkningsvarighed.

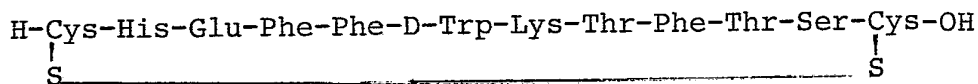
$$\text{H-Cys-X}^1\text{-X}^2\text{-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X}^4\text{OH} \quad \text{I}$$

SA
AS

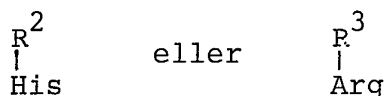
Den nu påviste selektive aktivitet samtidig med meget lang virkningsvarighed er bemærkelsesværdig, når man betænker, at aktivetsvarigheden for somatostatin indgivet intravenøst er på ca.



Som eksempler på særligt foretrukne forbindelser, som fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan nævnes:


$$\begin{array}{ccccccccccc} \text{X-Cys-X}^{1'}\text{-X}^{2'}\text{-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X}^4\text{-OR} & & & & & & & & & & \text{II} \\ | & & & & & & & & & & \\ \text{S}\alpha & & & & \text{R}^6 & \text{R}^7 & & \text{R}^8 & \text{R}^9 & \text{S}\beta & \end{array}$$

harpiksbærer, (dvs. R betyder en $-\text{CH}_2-$ polystyren-
harpiks-
bærer), X betyder hydro-
gen eller en α -aminobeskyttelsesgruppe, X^{I} betyder



hvor R^3 betyder en beskyttelsesgruppe for sidekædenitrogenatomerne i arginin, og R^2 betyder hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for imidazolnitrogenatomet i histidin, $X^{2'}$ betyder



hvor R^2 er som ovenfor anført, eller $X^{2'}$ betyder $\begin{array}{c} R^4 \\ | \\ \text{Glu} \end{array}$, hvor R^4 betyder en beskyttelsesgruppe for sidekædecarboxygruppen i glutaminsyre, R^6 betyder en beskyttelsesgruppe for sidekædeaminogruppen i lysin, R^7 , R^8 og R^9 hver især betyder beskyttelsesgrupper for hydroxylgrupperne i threonin og serin, X^4 som ovenfor anført, og α og β betyder hydrogenatomer, sulfhydrylbeskyttelsesgrupper eller tilsammen udgør en direkte binding imellem svovlatomerne.

Som eksempler på α -aminobeskyttelsesgruppen X kan nævnes

(1) acylbeskyttelsesgrupper, som f.eks. formyl, trifluoracetyl, phthalyl, p-toluensulfonyl (tosyl), nitrophenylsulfonyl med flere, (2) aromatiske urethanbeskyttelsesgrupper, som f.eks. benzyloxycarbonyl, og substitueret benzyloxycarbonyl, som f.eks. p-chlorbenzyloxycarbonyl og p-nitrobenzyloxycarbonyl, (3) aliphatiske urethanbeskyttelsesgrupper, som f.eks. tert.butyloxycarbonyl, diisopropylmethoxycarbonyl, isopropylloxycarbonyl, allyloxycarbonyl, 2,2,2-trichlorethoxycarbonyl og amyloxycarbonyl, (4) cycloalkylurethanbeskyttelsesgrupper, som f.eks. cyclopentylloxycarbonyl, adamantylcarbonyl og cyclohexylloxycarbonyl, (5) thiourethanbeskyttelsesgrupper, som f.eks. phenylthiocarbonyl, (6) alkylbeskyttelsesgrupper, som f.eks. triphenylmethyl (trityl), og (7) trialkylsilangrupper, som f.eks. trimethylsilan. Som α -aminobeskyttelsesgruppe foretrækkes tert.butyloxycarbonyl.

Som eksempler på R^3 kan nævnes nitro, tosyl, benzyloxycarbonyl, adamantylloxycarbonyl eller tert.butyloxycarbonyl. R^3 betyder fortrinsvis tosyl.

Nitro- eller tosylgruppen beskytter enten N^{ω} - eller $N^{\omega 1}$ -nitrogenatomerne i argininet, medens oxycarbonylbeskyttelsesgrupperne beskytter N^{δ} - og enten N^{ω} - eller $N^{\omega 1}$ -nitrogenatomerne.

Som eksempler på R^2 kan nævnes tosyl, benzyloxycarbonyl, adaman-

tyloxycarbonyl og tert.butyloxycarbonyl. R^2 betyder fortrinsvis tosyl.

Sidekædeaminogruppen i lysin beskyttes ved hjælp af R^6 , som f.eks. kan være tosyl, tert.amyloxycarbonyl, tert.butyloxycarbonyl, diisopropyloxycarbonyl, benzyloxycarbonyl, halogenbenzyloxycarbonyl, nitrobenzyloxycarbonyl o.lign., fortrinsvis 2-chlorbenzyloxycarbonyl.

Som eksempler på beskyttelsesgrupper R^7 , R^8 og R^9 for hydroxylgruppen i threonin og serin kan nævnes acetyl, benzoyl, tert.butyl og fortrinsvis benzyl.

Som eksempler på R^4 kan nævnes benzyl og tert.butyl.

Som eksempler på α - og β -beskyttelsesgrupper for sulfhydrylgrupperne i cysteinylaminosyreresterne kan nævnes benzyl, substitueret benzyl, hvor substituenten er mindst en af grupperne methyl, methoxy, nitro eller halogen (f.eks. 3,4-dimethylbenzyl, p-methoxybenzyl, p-chlorbenzyl, p-nitrobenzyl med flere), trityl, benzyloxycarbonyl, benzhydryl, p-methoxybenzyloxycarbonyl, benzylthiomethyl, ethylcarbamoyl, thioethyl, tetrahydropyranyl, acetamidomethyl, benzoyl, s-sulfon-salt med flere. p-Methoxybenzylgruppen foretrækkes.

Forbindelserne med formlen (I) fremstilles således ved fjernelse af alle beskyttelsesgrupperne og polystyrenharpiksbæreren, når den er til stede, fra en forbindelse med formlen (II) med den ovenfor angivne definition. Produktet oxideres om nødvendigt til dannelse af en direkte S-S-binding, så man får den cycliske kædeform, og isoleres om nødvendigt som den frie base eller som et farmakologisk acceptabelt salt.

Fjernelsen af beskyttelsesgrupperne kan gennemføres på de for de respektive beskyttelsesgrupper kendte måder. Fortrinsvis fjernes beskyttelsesgrupperne i ét enkelt trin, f.eks. ved anvendelse af hydrogenfluorid i nærværelse af anisol.

Polystyrenharpiksbæreren kan fraspaltes samtidigt med fjernelsen af beskyttelsesgrupperne, f.eks. ved anvendelse af hydrogenfluorid i nærværelse af anisol, eller den kan fraspaltes ved transesterifikation, hvorved der fås et carboxylbeskyttet mellemprodukt med formlen (II), hvor R er en esterfunktion. F.eks. tilvejebringes ved methanolyse et methylestermellemprodukt med formlen (II), hvor R betyder methyl. Ved hydrolyse af sådanne estere tilvejebringes den nødvendige C-ende-stillede carboxylfunktion.

Ved passende valg af beskyttelsesgrupper kan α - og β -beskyttelsesgrupperne fjernes selektivt fra forbindelserne med formlen (II), hvorved fås de frie disulfhydrylderivater med formlen (II), hvor α og β

betyder hydrogen. Når α og β betyder trityl eller acetamido, kan de f.eks. fjernes selektivt ved indvirkning af et merkuri- eller sølv-salt, hvorved fås det tilsvarende disulfhydrylderivat i form af dets tilsvarende merkuri- eller disølvsalt. Sidstnævnte salt kan underkastes virkningen af hydrogensulfid til dannelse af det tilsvarende frie disulfhydrylderivat med formlen (II).

Det frie disulfhydrylderivat med formlen (II) kan især cycliseres ved oxidation ved anvendelse af et oxidationsmiddel, som f.eks. iod, oxygen (f.eks. luft), 1,2-diiodoethan eller natrium- eller kaliumferricyanid, til dannelse af det tilsvarende forbindelse med formlen (I), hvori A-A er en direkte S-S-binding.

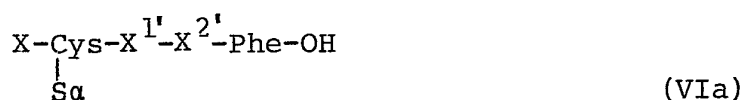
De nødvendige mellemprodukter kan fremstilles ved den kendte faststoffasemetode, jf. f.eks. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963), eller ved klassisk syntese. Til brug ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen tilvejebringes således forbindelser med formlen (II), hvor α og β er beskyttelsesgrupper, og R betyder en polystyrenharpiksbærer, hvorved de nødvendige, passende beskyttede og/eller aktiverede aminosyrer kobles fortløbende under faststoffasesyntesebetingelser til en chlormethyleret eller hydroxymethylharpiksbærer. Alternativt kan forbindelserne med formlen (II), hvor α og β er beskyttelsesgrupper, og R er en carboxylbeskyttelsesgruppe, fremstilles ved kobling af de nødvendige passende beskyttede og/eller aktiverede aminosyrer eller peptiddele på de til dannelse af peptidbindinger kendte måder til dannelse af den tilsigtede sekvens af aminosyrer. α - og β -beskyttelsesgrupperne kan derpå fjernes selektivt, og produktet kan oxideres, hvorved fås det cycliske disulfid med formlen (II), hvor α og β danner en direkte binding.

Ved valg af en bestemt sidekædebeskyttelsesgruppe, som skal anvendes til fremstilling af de omhandlede peptider, bør følgende retningslinjer overholdes: (a) sidekædebeskyttelsesgruppen skal være stabil over for reagenset og under reaktionsbetingelserne valgt til fjernelse af α -aminobeskyttelsesgruppen i hvert fremstillingstrin, (b) beskyttelsesgruppen skal bibeholde dens beskyttende egenskaber (dvs. ikke fraspaltes under koblingsbetingelser), og (c) sidekædebeskyttelsesgruppen skal kunne fjernes ved syntesens afslutning under reaktionsbetingelser, som ikke forandrer peptidkæden.

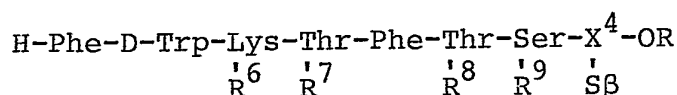
Udgangsforbindelserne kan fremstilles efter i og for sig kendte metoder, hvorved man

oparbejder det tilsigtede peptid ved kondensation af aminosyrer eller peptiddele, som om nødvendigt beskyttes. Kondensationsreaktionerne kan gennemføres ved anvendelse af de inden for peptid- og penicillinkemien alment kendte metoder til dannelse af peptidbindinger. Med henblik på at fremme kondensationen af aminosyrerne anvendes fortrinsvis et kondensationsmiddel. Som eksempler på kondensationsmidler kan nævnes carbodiimider, som f.eks. N,N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCC) og N,N'-diisopropylcarbodiimid. Alternativt kan kondensationen gennemføres ved aktivering af én eller begge endestillede grupper. Som eksempler på en aktiveret form af endestillet carboxyl kan nævnes syrechloridet, anhydridet, azidet eller den aktiverede ester. Det vil være indlysende for en fagmand, at den foreslåede metode til gennemførelse af kondensationsreaktionerne bør være forenelig med beskyttelsesgrupperne i aminosyrerne.

Ovennævnte kendte metode til oparbejdning af molekylet kan i princippet belyses ved kondensering af fortrinsvis et beskyttet peptid med formlen



med et beskyttet peptid med formlen



hvor R betyder en carboxybeskyttelsesgruppe (fortrinsvis benzyl), X, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, X^{1'}, X^{2'} og X⁴ har de ovennævnte betydninger, og α og β betyder beskyttelsesgrupper, fortrinsvis p-methoxybenzyl, hvorved fås en forbindelse med formlen (II), som derpå befries for beskyttelse og om ønsket cycliseres ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Når faststoffasemetoden anvendes på de omhandlede forbindelser kobles α-amino- og sulfhydryl-beskyttet cystein først til en chlor-methyleret polystyrenharpiks, hvorpå α-aminobeskyttelsesgruppen fjernes med trifluoreddikesyre i methylenchlorid, trifluoreddikesyre alene eller HCl i dioxan. Fjernelsen af α-aminobeskyttelsesgruppen gennemføres ved en temperatur på mellem 0°C og stuetemperatur. Andre standard-fraspaltningsreagenser og betingelser til fjernelse af specifikke α-aminobeskyttelsesgrupper kan anvendes, jf. Schroder and Lubke, "The Peptides", 1, side 72-75 (Academic Press, 1965). Når α-aminobeskyttelsesgruppen er fjernet, kobles de næste tilsigtede beskyttede

amino-syrer individuelt til den harpiksbårne sekvens i rækkefølge. Alternativt kan der fremstilles små peptidfragmenter, f.eks. ved opløsningsmetoden, som kan sættes til en faststoffase-reaktor i den ønskede rækkefølge. Den individuelle beskyttede aminosyre eller aminosyresekvens sættes til faststoffase-reaktoren i et omtrentligt firedobbelt overskud. Koblingen gennemføres i dimethylformamid, methylenchlorid eller en blanding af de to opløsningsmidler. Udfaldet af hver koblingsreaktion i hvert trin i syntesen bestemmes ved hjælp af ninhydrinreaktionen, jf. E. Kaiser et al., *Analyt. Biochem.*, 34, 595 (1970). I tilfælde af ufuldstændig kobling, gentages reaktionen, før α -aminobeskyttelsesgruppen fjernes til indføring af den næste aminosyre eller aminosyresekvens.

De foretrukne koblingsreagenser er l-hydroxybenzotriazol og diisopropylcarbodiimid. Andre sådanne reagenser vil være kendte for en fagmand.

Når den tilsigtede aminosyresekvens er fremstillet, fjernes polypeptidet fra harpiksbæreren ved behandling med f.eks. hydrogenfluorid og anisol, hvorved fås det ikke længere på nogen måde beskyttede lineære polypeptid. Det cycliske disulfid kan om ønsket fremstilles, f.eks. ved luftoxidation eller ved oxidation med $K_3Fe(CN)_6$.

Ikke giftige additionssalte af de lineære og cycliske polypeptider fremstilles ved de inden for teknikken kendte metoder ud fra saltsyre, hydrogenbromidsyre, svovlsyre, phosphorsyre, polyphosphorsyre, maleinsyre, eddikesyre, citronsyre, benzoesyre, ravsyre, malonsyre eller ascorbinsyre o.lign. Eddikesyresaltet foretrækkes.

De under hele faststoffasefremstillingen anvendte beskyttelsesgrupper er kendte inden for teknikken. α -Aminobeskyttelsesgrupperne anvendt med hver aminosyre indført i sekvensen af det endelige polypeptid er (1) acylbeskyttelsesgrupper, som f.eks. formyl, trifluoracetyl, phthalyl, p-toluensulfonyl (tosyl), nitrophenylsulfenyl o.lign., (2) aromatiske urethanbeskyttelsesgrupper, som f.eks. benzyl-oxycarbonyl, og substitueret benzyloxycarbonyl, som f.eks. p-chlorbenzyloxycarbonyl og p-nitrobenzyloxycarbonyl, (3) aliphatiske urethanbeskyttelsesgrupper, som f.eks. tert.butylloxycarbonyl, diisopropylmethoxycarbonyl, isopropylloxycarbonyl, allyloxycarbonyl, 2,2,2-trichlorethoxycarbonyl og amyloxycarbonyl, (4) cycloalkylurethanbeskyttelsesgrupper, som f.eks. cyclopentylloxycarbonyl, adamantylloxycarbonyl og cyclohexylloxycarbonyl, (5) thiourethanbeskyttelsesgrupper, som f.eks. phenylthiocarbonyl, (6) alkylbeskyttelsesgrupper, som f.eks. triphenylmethyl (trityl) og (7) trialkylsilangrupper, som f.eks. tri-

methyلسilan. Den foretrukne α -aminobeskyttelsesgruppe er tert.butyl-oxy-carbonyl.

De fremstillede forbindelser kan forekomme i den monomere cycliske form (også betegnet den "oxiderede" form), dvs. A-formen hvor der er en enkeltbinding imellem svovlatomerne på de to Cys-aminosyreester, eller de kan forekomme i den lineære B-form, hvori A betegner hydrogenatomer, dvs. den reducerede form.

På grund af de fremstillede somatostatinanaloges farmakologiske virkning, kan de anvendes ved behandlingen af akromegali og diabetes på samme måde som det er tilfældet for somatostatin selv. Peptiderne kan indgives på den for somatostatin og beslægtede polypeptider gængse måde under vejledning af en læge i en mængde, som retter sig efter dysfunktionens omfang konstateret af lægen. Forbindelserne kan indgives alene eller sammen med konventionelle farmaceutisk acceptabel bærere og hjælpestoffer i enhedsdosisform.

Som tidligere anført er de fremstillede forbindelser også anvendelige i blanding med insulin til behandling af varmblodede dyr, som lider af diabetes mellitus, jf. f.eks. beskrivelsen til US patent nr. 3.912.807, hvori er beskrevet anvendelsen af en effektiv mængde af et præparat indeholdende somatostatin blandet med insulin, til behandling af et varmblodet dyr, som lider af diabetes mellitus.

Når forbindelserne anvendes terapeutisk som midler til behandling af akromegali, juvenil diabetes og diabetes mellitus, påbegyndes behandlingen med små doser, som er mindre end den optimale dosis af forbindelsen. Derefter forøges dosis langsomt, indtil den under omstændighederne optimale virkning er opnået. Generelt indgives de fremstillede somatostatinanaloge i sådanne mængder, som sædvanligvis vil tilvejebringe effektive resultater uden at forårsage skadelige eller ødelæggende bivirkninger. Dosis kan imidlertid varieres alt afhængigt af patientens behov og den anvendte forbindelse. For nemheds skyld kan den samlede dagdosis eventuelt deles og indgives portionsvis i løbet af dagen.

I overensstemmelse hermed bringes et sådant farmaceutisk præparat bestående af en forbindelse med formlen (I) eller et farmakologisk acceptabelt salt deraf i kombination med en farmakologisk acceptabel bærer fortrinsvis på enhedsdosisform.

Analogifremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nær-

mere i nedenstående eksempler, hvori benyttes følgende forkortelser for beskyttelsesgrupper, opløsningsmidler m.v.

Boc = tert.butyloxycarbonyl
Cl₂Bzl = dichlorbenzyl
ClZ = 2-chlorbenzyloxycarbonyl
Tos = tosyl(p-toluensulfonyl)
TFA = trifluoreddikesyre
EDT = 1,2-ethandithiol
DMF = dimethylformamid
TEA = triethylamin
AcOH = eddikesyre
EtOAc = ethylacetat
n-BuOH = n-butanol
NEt₃ = triethylamin
DIC = diisopropylcarbodiimid
HF = hydrogenfluorid
NH₄OAc = ammoniumacetat

Eksempel 1

Tert.-butyloxycarbonyl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteiny-N^{im}-tosyl-L-histidyl-N^{im}-tosyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-N^ε-2-chlorbenzyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteiny-hydroxymethylpolystyren

Chlormethyleret polystyrenharpiks (Lab Systems, Inc.), der er 1% tværbundet med divinylbenzen, esterificeres med BOC-Cys(SMBzl)OH i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Gisin, Helv. Chim. Acta., 56, 1976 (1973). Polystyrenharpiksesteren behandles ifølge nedenstående forskrift A til inkorporering af BOC-Ser(Bzl)OH, BOC-Thr(Bzl)OH, BOC-Phe-OH, BOC-Thr(Bzl)OH, BOC-Lys(Clz)OH, BOC-D-Trp-OH, BOC-Phe-OH, BOC-Phe-OH, BOC-His(Tos)OH, BOC-His(Tos)OH og BOC-Cys(SMBzl)OH, hvorved fås den ønskede peptidoharpiks.

Forskrift A

1. Vaskning med 3 x CH₂Cl₂.
2. Behandling med TFA:CH₂Cl₂:EDT (1:1:5% , efter rumfang/rumfang) i 5 minutter.
3. Behandling som i trin 2 i 25 minutter.
4. Vaskning med 3 x CH₂Cl₂.
5. Vaskning med DMF.
6. Behandling med 12% 's TEA i DMF to gange i 3 minutter.
7. Vaskning med DMF.
8. Vaskning med 3 x CH₂Cl₂.
9. Behandling med 4 ækvivalenter af det tilsvarende aminosyrederivat i CH₂Cl₂:DMF og omrøring i 5 minutter.
10. Tilsætning i to portioner af 5 ækvivalenter DIC opløst i CH₂Cl₂ i løbet af 30 minutter. Reaktionsid = 6 timer.
11. Vaskning med 3 x DMF.
12. Vaskning med 3 x CH₂Cl₂.
13. Gennemførelse af ninhydrinreaktionen i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Kaiser et al., Annal. Biochem., 34 595 (1970). I tilfælde af ufuldstændig reaktion gentages ovennævnte trin 9-13.

Eksempel 2

L-Cysteiny-L-histidyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-cystein-cyclisk (1-12) disulfid

9 g af peptidoharpiksen fremstillet ved den i **eksempel 1** angivne fremgangsmåde blandes med 18 mg anisol og behandles med 180 ml flydende HF i 45 minutter i isbad. Overskydende HF fjernes i vakuum så hurtigt som muligt (ca. 1 time), og remanensen ekstraheres med aflufttet 2M iseddike, hvorpå den filtreres. Filtratet vaskes med ether, og det vandige lag oxideres med $K_3Fe(CN)_6$ ved en pH-værdi på 7. Overskuddet af oxidationsmidlet fjernes ved hjælp af en "Bio Rad"[®]-AG-3-ionbytterharpiks, hvorpå peptidet absorberes på en "Bio Rex"[®]-70-ionbytterharpiks og elueres med en pyridinpuffer med en pH-værdi på 7, og efter lyofilisation fås 1,5 g materiale. Dette materiale sættes til en "Sephadex"[®] G-15-søjle (2,5 x 160 cm) og elueres med 15%'s vandig eddikesyre. Fraktionerne (hver 5,2 ml) i rør 88-90 hældes sammen og lyofiliseres, hvorved fås den ønskede forbindelse i en mængde på 174 mg.

R_f (BWA, 4:1:1) 0,45

R_f (BWAP, 30:24:6:20) 0,64

Aminosyreanalyse: Thr(2) 1,87, Ser(1) 0,89, Cys(2) 1,16, Phe(3) 3, Lys(1) 1,05, His(2) 1,76, Trp ej bestemt.

Eksempel 3

Den farmakologiske virkning in vivo for dodecapeptidet fremstillet ved den i eksempel 2 angivne fremgangsmåde påvises som beskrevet nedenfor med de anførte resultater.

Undertrykkelse af væksthormon

En subcutan (s.c.) injektion af peptid opløseliggjort eller suspenderet i fysiologisk saltopløsning gives til "Charles River" CD hanrotter, som ikke har fastet. Rotter, som tilsvarende har fået en s.c. injektion af en kontrolsaltopløsning, tjener som kontroldyr, således at hver forsøgsrotte sammenlignes med en kontrolrotte. Rotterne holdes i separate bure, og 20 minutter før forsøgsperiodens ophør giver man dem en intraperitoneal (i.p.) injektion "Nembutal"[®] i en dosis på 50 mg/kg. Blodprøver fås ved cardialpunktur, og plasmaet isoleres til radioimmunoanalyse for væksthormon(VH)koncentrationen (ng/ml). Tidsperioder

på 2 og 4 timer efter injektion anvendes til at undersøge varigheden af peptidets evne til at undertrykke cirkulerende perifere VH-niveauer. VH-Værdier for kontrol og forsøg sammenlignes hver gang og bedømmes ifølge the Student "t"-test, og den statistiske signifikans (p) ved niveauet 0,05 eller derunder anvendes som virkningsindeks.

<u>Forbindelse (dosis)</u>	<u>2 Timer</u>	<u>4 Timer</u>
Kontrol	118 $\pm$ 20	115 $\pm$ 23
Forbindelse iflg. ekssmpl. 2 (1 mg/kg)	32 $\pm$ 6	62 $\pm$ 13
	p = <0,01	p = <0,01

Undertrykkelse af væksthormon, glucagon og insulin.

Albino-hanrotter fordeles i tre grupper (9 rotter/gruppe) og injiceres i.p. med 50 mg/kg "Nembutal" ^R. Efter 15 minutter injiceres de s.c. afhængigt af deres gruppe med (a) testforbindelsen, typisk 10-2000 µg/kg, (b) SRIF 200 µg/kg eller (c) fysiologisk saltopløsning. Efter 10 minutter injiceres 0,5 ml arginin (300 mg/ml, pH = 7,2) ind i hjertet på dyrene. Fem minutter efter arginininjektionen skæres hovederne af rotterne, og blodet opsamles i trasylo1-EDTA. Passende alikvoter undersøges derpå for væksthormon, glucagon og insulin. En aktiv forbindelse er en forbindelse, som forandrer plasmaniveauet betydeligt for et vilkårligt af disse hormoner i forhold til plasmaniveauet for saltopløsningskontrollerne. Sammenligninger imellem kontrol- og forsøgs-værdier foretages ved statistisk bedømmelse ved variansanalyse, og den statistiske signifikans (p) ved 0,05 eller derunder anvendes som virkningsindeks.

<u>Forbindelse</u>		<u>Insulin</u>	<u>Glucagon</u>
<u>(dosis µg/kg)</u>	<u>VH (ng/ml)</u>	<u>(µI/ml)</u>	<u>pg/ml</u>
Kontrol (fysiologisk saltvand)	163 $\pm$ 29	278 $\pm$ 32	69 $\pm$ 13
Forbindelse iflg. ekssmpl. 2 (100 µg/kg)	20 $\pm$ 8	202 $\pm$ 49	20 $\pm$ 8
	p = < 0,01	p = <0,05	p = <0,01

Eksempel 4

Tert.-butyloxycarbonyl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteiny-N^{gn}-tosyl-L-
-arginyl-N^{im}-tosyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryp-
tophyl-N^ε-2-chlorbenzyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-
-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-p-methoxybenzyl-
-L-cysteiny-hydroxymethyl-polystyrenester

Chlormethyleret polystyrenharpiks (Lab Systems, Inc.), der er 1% tværbundet med divinylbenzen, esterificeres med Boc-Cys(SMBzl)-OH i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Gisin, Helv. Chim. Acta., 56, 1976 (1973). Polystyrenharpiksesteren behandles ifølge forskrift A til inkorporering af Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Lys(ClZ)-OH, Boc-D-Trp-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Phe-OH, Boc-His(Tos)-OH, Boc-Arg(Tos)-OH og Boc-Cys(SMBzl)-OH, hvorved fås den ønskede peptidharpiks.

Forskrift A

1. Vaskning med 3 x CH₂Cl₂.
2. Behandling med TFA:CH₂Cl₂:EDT (1:1:5%, r/r) i 5 minutter.
3. Behandling som i trin 2 i 25 minutter.
4. Vaskning med 3 x CH₂Cl₂.
5. Vaskning med DMF.
6. Behandling med 12%'s TEA i DMF to gange i 3 minutter.
7. Vaskning med DMF.
8. Vaskning med 3 x CH₂Cl₂.
9. Behandling med 4 ækvivalenter af det tilsvarende aminosyrederivat i CH₂Cl₂:DMF og omrøring i 5 minutter.
10. Tilsætning i to portioner af 5 ækvivalenter DIC opløst i CH₂Cl₂ i løbet af 30 minutter. Reaktionsid = 6 timer.
11. Vaskning med 3 x DMF.
12. Vaskning med 3 x CH₂Cl₂.
13. Gennemførelse af ninhydrinreaktionen i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Kaiser et al., Anal. Biochem., 34, 595 (1970). I tilfælde af ufuldstændig reaktion gentages trinene 9-13.

Eksempel 5

L-Cysteinyll-L-arginyll-L-histidyll-L-phenylalanyll-L-phenylalanyll-D-tryptophyll-L-lysyll-L-threonyll-L-phenylalanyll-L-threonyll-L-seryll-L-cystein-cyclisk (1-12) disulfid

8,5 g af peptidoharpiksen fremstillet ved den i eksempel 4 angivne fremgangsmåde blandes med 16 ml anisol og behandles med 100 ml flydende HF i 45 minutter. Overskydende HF fjernes i vakuum så hurtigt som muligt, og remanensen optages i 25%'s vandig eddikesyre. Polymerbæreren frafiltreres, og filtratet vaskes med ether. Det vandige lag hældes i 3,5 liter vand, pH-værdien indstilles med NH_4OH på 7, hvorpå sulfhydrylforbindelsen oxideres med $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. pH-Værdien indstilles på 5 med iseddike, og det uorganiske oxidationsmiddel fjernes med

"Bio Rad" AG 3. Peptidmaterialet absorberes på "Bio Rex"[®] 70 og elueres med en pyridinpuffer med en pH-værdi på 7, hvorved fås 2 g af den rå forbindelse. Dette materiale ledes igennem en "Sephadex"-G-15-søjle (2,5 x 160 cm) og elueres med 15%'s vandig eddikesyre. 886 mg af dette materiale i fraktioner 47 til 93 (hver fraktion = 5,2 ml) sættes til en CM-"Sephadex"[®] G-25-søjle og elueres med en trinvis NH_4OAc -gradient (0,1 til 0,3 molært NH_4OAc), hvorved fås den ønskede forbindelse. Dette materiale sættes til en "Sephadex"[®] LH-20-søjle (2,5 x 92 cm) og elueres med 10%'s vandig eddikesyre. Den rene ønskede forbindelse fremkommer i fraktioner 55 til 63 (hver fraktion = 4,1 ml) i en mængde på 159 mg.

R_f (BWA, 4:1:1) 0,46

R_f (BWAP, 30:24:6:20) 0,65

Aminosyreanalyse: Thr (2) 1,94, Ser (1) 0,91, Cys (2) 1,79,
Phe (3) 3, His (1) 1,02, Lys (1) 0,85,
Arg (1) 0,95, Trp ej bestemt.

Eksempel 6

Den farmakologiske virkning in vivo for den ønskede forbindelse fremstillet ved den i eksempel 5 angivne fremgangsmåde påvises som beskrevet nedenfor med de anførte resultater:

Undertrykkelse af væksthormon, glucagon og insulin.

Albino-hanrotter fordeles i to grupper (9 rotter/gruppe) og injiceres i.p. med 50 mg/kg "Nembutal"[®]. Efter 15 minutter injiceres

rotterne s.c. afhængigt af deres gruppe med testforbindelsen eller fysiologisk saltopløsning. Efter 10 minutter injiceres 0,5 ml arginin (300 mg/ml, pH = 7,2) ind i hjertet. Rotternes hoveder skæres af 5 minutter efter arginininjektionen, og blodet opsamles i trasylo-EDTA. Passende alikvoter undersøges derpå for væksthormon (VH), glucagon (GLUN) og insulin (INS). En aktiv forbindelse er en forbindelse, som forandrer plasmaniveauet betydeligt for et vilkårligt af disse hormoner i forhold til plasmaniveauet for saltopløsningskontrollerne. Sammenligninger imellem kontrol- og forsøgsværdier foretages ved statistisk bedømmelse ved variansanalyse, og den statistiske signifikans (p) ved 0,05 eller derunder anvendes som virkningsindeks.

Resultater

<u>Forsøg</u>	<u>Dosis</u> <u>µg/kg</u>	<u>VH</u> <u>ng/ml</u>	<u>INS</u> <u>µI/ml</u>	<u>GLUN</u> <u>pg/ml</u>
1 Kontrol (saltvand)	---	257 ± 49	177 ± 19	61 ± 9
	100	61 ± 5 [*]	52 ± 16 [*]	0 ± 0 [*]
2 Kontrol (saltvand)	---	131 ± 43	262 ± 26	42 ± 6
	10	71 ± 21 [*]	238 ± 72	4 ± 3 [*]

* p = < 0,01

Eksempel 7

Tert.-butoxy-carbonyl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteiny-N^{im}-tosyl-L-histidyl-N^{im}-tosyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-ε-2-chlorbenzyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-p-methoxybenzyl-D-cysteiny-hydroxymethyl-polystyrenester

Chlormethyleret polystyrenharpiks (Lab Systems, Inc.), der er 1% tværbundet med divinylbenzen, esterificeres med Boc-D-Cys(SMBzl)OH i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Gisin, Helv. Chim. Acta, 56 1976 (1973). Polystyrenharpiksen behandles i overensstemmelse med forskrift A, jfr. eks. 1 til inkorporering af Boc-Ser(Bzl)OH, Boc-Thr(Bzl)-

OH, Boc-Phe-OH, Boc-Thr(Bzl)OH, Boc-Lys(ClZ)OH, Boc-D-Trp-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Phe-OH, Boc-His(Tos)OH, Boc-His(Tos)OH og Boc-Cys(SmBzl)OH, hvorved fås den ønskede peptidoharpiks.

Eksempel 8

L-Cysteinyll-L-histidyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-D-cystein-cyclisk (1-12) disulfid-diacetatsalt

10 g af peptidoharpiksen fremstillet ved den i eksempel 7 angivne fremgangsmåde blandes med 20 ml anisol og behandles med 150 ml flydende HF i isbad i 45 minutter under udelukkelse af luft. Overkydende flydende HF fjernes under vakuum, og remanensen optages i 50%'s vandig eddikesyre. Blandingen filtreres, og filtratet fortyndes med vand indtil 3,5 liter. pH-Værdien indstilles på 7 med fortyndet NH_4OH , og disulfhydrylpeptidet oxideres med $\text{K}_3\text{F}(\text{CN})_6$ til cyclisk disulfid. Blandingens pH-værdi indstilles på 5 med iseddike og behandles med "Bio-Rad"® AG 3. Peptidmaterialet absorberes på "Bio Rex"® 70 (H^+ -form) og elueres med en pyridinpuffer ($\text{Py-H}_2\text{O}$ -eddikesyre, 30:66:4, r/r). Fraktionerne indeholdende peptidmaterialet hældes sammen og lyofiliseres, hvorved fås 1,6 g råmateriale. Dette råprodukt sættes til en "Sephadex"®-LH-20-søjle (2,5 x 90 cm) og elueres med 10%'s vandig eddikesyre (hver fraktion = 5,8 ml). Materialet, som fremkommer i fraktioner 97-101 hældes sammen og lyofiliseres, hvorved fås det ønskede dodecapeptid i en mængde på 171 mg.

Tyndtlagskromatografi: forovertrukne glasplader ("Avicel"®), R_f (BWA, 4:1:1, r/r) 0,32, R_f (BWAP, 30:24:6:20, r/r) 0,56.

Aminosyreanalyse: Thr(2) 1,85, Ser(1) 0,84, Cys(2) 1,29, Phe(3) 3, Lys(1) 1,05, His(2) 1,41, Trp(1) 0,75.

Den farmakologiske virkning in vivo for dodecapeptidet fremstillet ved den i eksempel 8 angivne fremgangsmåde påvises som beskrevet i eksempel 13. De fremkomne data er anført nedenfor:

Undertrykkelse af væksthormon

<u>Forbindelse (dosis)</u>	<u>2 Timer</u>	<u>4 Timer</u>
Kontrol	127 $\pm$ 22	59 $\pm$ 20
Forbindelse ifølge eksempel 8 (1 mg/kg)	20 $\pm$ 3 ^{**}	107 $\pm$ 34

** p = <0,001

Undertrykkelse af væksthormon, glucagon og insulin.

<u>Forbindelse (dosis µg/kg)</u>	<u>VH (ng/ml)</u>	<u>Insulin µI/ml</u>	<u>Glucagon pg/ml</u>
Kontrol (saltvand)	279 $\pm$ 53	323 $\pm$ 30	42 $\pm$ 6
Forbindelse ifølge eksempel 8 (100)	64 $\pm$ 20 [*]	165 $\pm$ 21 [*]	5 $\pm$ 2 [*]

Undertrykkelse af væksthormon, glucagon og insulin. (fortsat)

<u>Forbindelse (dosis (µg/kg)</u>	<u>VH (ng/ml)</u>	<u>Insulin (µI/ml)</u>	<u>Glucagon (pg/ml)</u>
Kontrol (saltvand)	201 $\pm$ 35	397 $\pm$ 36	117 $\pm$ 11
Forb. iflg. eksmpl. 8 (100)	110 $\pm$ 22 ⁺	318 $\pm$ 54	70 $\pm$ 7 [*]

* p <0,01

+ p <0,05

Af det ovenfor anførte fremgår det, at peptidet ifølge Eksempel 8 er karakteriseret ved undertrykkelsen af glucagon og væksthormon, uden at det påvirker insulinsekretionen væsentligt.

Eksempel 9

Tert.-butyloxycarbonyl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteinyl-N^{gn}-tosyl-L-
 -arginyl-γ-benzyl-L-glutamyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryp-
 tophyl-N^ε-2-chlor-benzyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-
 -phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-p-methoxybenzyl-
 -L-cystein-hydroxymethyl-polystyrenester

Chlormethyleret polystyrenharpiks esterificeres med Boc-Cys-
 (SMBzl)-OH i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Gisin, Helv.
 Chim. Acta., 56, 1976 (1973). Aminosyreharpiksesteren behandles derpå
 ifølge nedenstående forskrift A, hvor der som den beskyttede amino-
 syre i trin 9 anvendes Boc-Ser(Bzl)-OH. Forskrift A gentages derpå
 med henblik på at inkorporere nedenstående aminosyrer fortløbende
 i peptidoharpiksen:

Boc-Thr(Bzl)-OH
 Boc-Phe-OH
 Boc-Thr(Bzl)-OH
 Boc-Lys(ClZ)-OH
 Boc-D-Trp-OH
 Boc-Phe-OH
 Boc-Phe-OH
 Boc-Glu(OBzl)-OH

 Boc-Arg(Tos)-OH
 Boc-Cys(SMBzl)-OH

Forskrift A: (til behandling af harpiksesteren)

1. Vaskning med 3 x methylenchlorid (CH₂Cl₂).
2. Behandling med trifluoreddikesyre:methylenchlorid (1:1, r/r)
 indeholdende 5%'s 1,2-ethandithiol i 5 minutter
3. Gentagelse af trin 2 i 25 minutter.
4. Vaskning med 3 x CH₂Cl₂.
5. Vaskning med dimethylformamid (DMF).
6. Behandling med 12%'s triethylamin i DMF i 3 minutter.
7. Vaskning med DMF.
8. Vaskning med 3 x CH₂Cl₂.

9. Behandling med 4 ækvivalenter af den passende beskyttede aminosyre i CH_2Cl_2 :DMF og omrøring i 5 minutter.
10. Tilsætning i to portioner af 5 ækvivalenter diisopropylcarbodiimid opløst i CH_2Cl_2 i løbet af 30 minutter. Reaktionsid = 6 timer.
11. Vaskning med 3 x DMF.
12. Vaskning med 3 x CH_2Cl_2 .
13. Gennemførelse af ninhydrinreaktionen i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Kaiser et al., Annal. Biochem., 34 595 (1970). I tilfælde af ufuldstændig reaktion gentagelse af trin 9-13.

Eksempel 10

L-Cysteinyl-L-arginyl-L-glutamyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-cystein-cyclisk (1-12) disulfid

8,5 g af peptidoharpiksen fremstillet ved den i eksempel 9 angivne fremgangsmåde suspenderes i 16 ml anisol og behandles med vandfrit flydende hydrogenfluorid (HF) i 45 minutter i isbad, hvorpå overskydende HF fjernes under vakuum, og remanensen ekstraheres med 10%'s vandig eddikesyre. Filtratet vaskes med ether, og det vandige lag hældes i 5 liter vand, hvorpå pH-værdien bringes på 7 med fortyndet ammoniumhydroxid. Blandingen omrøres i fri luft i 48 timer, hvorefter pH-værdien indstilles på 5 med iseddike, og peptidet absorberes på "Amberlite"® CG-50 (H^+ -form). Peptidmateriale elueres med 50%'s vandig eddikesyre og lyofiliseres, hvorved fås 850 mg af et fast materiale.

Råproduktet sættes til en "Sephadex"® LH-20-søjle (2,5 x 150 cm) og elueres med 10%'s eddikesyre. Fraktionerne 94-130 hældes sammen og lyofiliseres, hvorved fås 483 mg af materialet. Dette materiale sættes til en "Sephadex"® 625-søjle (1,5 x 115 cm) og elueres med 10%'s vandig eddikesyre. Fraktionerne 43-53 hældes sammen og lyofiliseres, hvorved fås det ønskede peptid i en mængde på 286 mg.

Tyndtlagskromatografi: forovertrukne glasplader (Avicel), R_f (BWA, 4:1:1, r/r) 0,40, R_f (BWAP, 30:24:6:20, r/r) 0,65.

Aminosyreanalyse: Thr(2) 1,92, Ser(1) 0,89, Glu(1) 1,03, Cys(2) 1,49, Phe(3) 3, Lys(1) 1,05, Trp(1) 0,81, Arg(1) 1,02.

Eksempel 11

Tert.-butyloxycarbonyl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteinyl-N^{im}-tosyl-L-histidyl- γ -benzyl-L-glutamyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-N^ε-2-chlorbenzyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-p-methoxybenzyl-L-cystein-hydroxymethyl-polystyrenester

Chlormethyleret polystyrenharpiks esterificeres med Boc-Cys-(SMBzl)-OH i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Gisin, Helv. Chim. Acta., 56, 1976 (1973). Aminosyreharpiksen behandles derpå ifølge forskrift A (jf. eksempel 9), idet der som den beskyttede aminosyre i trin 9 anvendes Boc-Ser(Bzl)-OH. Forskrift A gentages derpå med henblik på at inkorporere nedenstående aminosyrer fortløbende i peptidoharpiksen:

Boc-Thr(Bzl)-OH
 Boc-Phe-OH
 Boc-Thr(Bzl)-OH
 Boc-Lys(ClZ)-OH
 Boc-D-Trp-OH
 Boc-Phe-OH
 Boc-Phe-OH
 Boc-Glu(OBzl)-OH
 Boc-His(Tos)-OH
 Boc-Cys(SMBzl)-OH

Eksempel 12

L-Cysteinyl-L-histidyl-L-glutamyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L-cystein-cyclisk (1-12) disulfid

8 g af peptidoharpiksen fremstillet ved den i eksempel 11 angivne fremgangsmåde behandles med flydende vandfrit HF som beskrevet i eksempel 10, og det lineære disulfhydryldodecapeptid cycliseres ved oxidation med K₃Fe(CN)₆ ved en pH-værdi på 7,3 og i kraftig fortynding. pH-Værdien indstilles på 5 med iseddike, og blandingen behandles med en "Bio-Rad" [®] AG3-X4-ionbytterharpiks (Cl-form), hvorpå den absorberes på "Amberlite" [®] CG 50 (H⁺-form). Peptidmaterialet elueres

med 30%'s vandig eddikesyre og lyofiliseres, hvorved fås 500 mg af et råmateriale. Dette materiale kromatograferes igennem en "Sephadex"-LH-20-søjle, hvorved fås det ønskede dodecapeptid.

Tyndtlagskromatografi: forovertrukne glasplader (Avicel), R_f (BWA, 4:1:1, r/r) 0,43, R_f (tert.-AmOH-Py-W, 7:7:6, r/r) 0,74.

Aminosyreanalyse: Thr(2) 1,92, Ser(1) 0,93, Glu(1) 0,94, Cys(2) 1,59, Phe(3) 3, Lys(1) 1,02, His(1) 0,91, Trp(1) 0,81.

Eksempel 13

Den biologiske virkning for peptiderne fremstillet ved de i eksemplerne 10 og 12 angivne fremgangsmåder påvises som følger.

Albino-hanrotter indgives i.p. 50 mg/kg "Nembutal"[®]. Efter 15 minutter injiceres rotterne s.c. med testforbindelsen af fysiologisk saltopløsning. Efter 10 minutter injiceres 0,5 ml arginin (300 mg/ml, pH = 7,2) ind i hjertet på dyrene. 5 Minutter senere skæres rotternes hoveder af, og blodet opsamles i trasyllol-EDTA. En passende alikvote undersøges for væksthormon (VH), insulin og glucagon ved radioimmunoanalyse. Resultaterne er anført nedenfor:

Forbindelse	Dosis µg/kg	VH ng/kg	Insulin µI/ml	Glucagon pg/ml	Antal dyr
Kontrol	--	277 ± 69	301 ± 27	46 ± 8	10
Forb. iflg. eksmpl. 10	200	42 ± 6 ^x	115 ± 16 ^x	1,5 ± 1 ^x	10
Kontrol	--	216 ± 35	283 ± 28	55 ± 5	10
Forb. iflg. eksmpl. 10	40	28 ± 5 ^x	158 ± 57	12 ± 2 ^x	10
Kontrol	--	454 ± 106	269 ± 37	60 ± 10	10
Forb. iflg. eksmpl. 12	200	107 ± 29 ^x	205 ± 36	4 ± 2 ^x	10
Kontrol	--	233 ± 35	342 ± 45	44 ± 4	10
Forb. iflg. eksmpl. 12	50	84 ± 17 ^x	322 ± 40	10 ± 4 ^x	10

^x p = < 0,01

Disse data indicerer, at peptiderne ifølge eksempel 10 og 12, er effektive midler til mindskelse af væksthormon og glucagon, uden at de væsentligt påvirker insulinniveauer ved en dosis på henholdsvis 40 mg/kg og 50 mg/kg. Peptiderne ifølge eksempel 10 og 12 testes også for varigheden af deres virkning på VH-sekretion hos rotter behandlet med "Nembutal"®. Peptidet ifølge eksempel 10 udviser en betydelig inhibering af VH i mindst 4 timer ved en s.c. dosis på 1000 mg/kg. Peptidet ifølge eksempel 12 udviser ingen betydelig inhibering af VH ved 2 og 4 timer.

De omhandlede forbindelser kan indgives til varmblodede pattedyr enten intravenøst, subcutant, intramuskulært eller oralt til regulering af serumglucose ved behandlingen af diabetes. Dosismængden vil variere alt afhængigt af hvilken tilstand, der skal behandles, graden af tilstanden og behandlingens varighed.

De omhandlede aktive forbindelser kan indgives alene eller i kombination med farmaceutisk acceptable bærere eller strækkemidler. Egnede farmaceutiske præparater vil være indlysende for en fagmand.

Eksempel 14

Klassisk syntese af L-cysteinyl-L-histidyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-treonyl-L-phenylalanyl-L-treonyl-L-seryl-L-cystein-cyclisk (1→12) disulfid

(a) N-benzyloxycarbonyl-im-benzyloxycarbonyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-methylester (I)

En suspension af 42,3 g (0,1 mol) Z-His(Z)-OH og 21,8 g (0,1 mol) Phe-OMe-HCl (98%'s) i 1000 ml CH₂Cl₂ afkøles til 0°C, hvorpå der tilsættes 22 g (0,12 mol) DCC og 10,1 g (0,10 mol) triethylamin. Blandingen henstilles ved stuetemperatur natten over.

Det udskilte dicyclohexylurinstof frafiltreres, og filtratet koncentrerer til et gummiagtigt materiale. Materialet opløses i ethylacetat, og uopløst materiale frafiltreres. Ethylacetatopløsningen vaskes med 5%'s citronsyre, H₂O, iskold 5%'s natriumhydrogencarbonatopløsning og H₂O. Det organiske lag tørres over natriumsulfat og koncentrerer til 1/3 af dets oprindelige volumen, der tilsættes 500 ml ether, indtil opløsningen bliver uklar, og opløsningen henstilles koldt natten over. Det fremkomne hvide faste stof isoleres og tørres. Udbytte: 32 g. Smp. 131-133°C.

Tyndtlagskromatografi: silicagel F-254, CH₂Cl₂:MeOH (9:1),
R_f = 0,8.

(b) Im-benzyloxycarbonyl-L-histidyl-L-phenylalanylmethylester-dihydrobromidsalt (II)

30 g (0,5 mol) Z-His(Z)-Phe-OMe (I) opløses i 300 ml 32%'s HBr-HOAc (opløsningen bliver uklar efter 2 minutter), og blandingen henstilles ved stuetemperatur i 30 minutter. Der tilsættes ether med henblik på udfældning. Det bløde faste stof filtreres og tørres natten over. Udbytte: 32 g fast stof, smp. 135-137°C.

Tyndtlagskromatografi: ingen bevægelse.

(c) N-Benzyloxycarbonyl-im-benzyloxycarbonyl-L-histidyl-im-benzyloxycarbonyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-methylester (III)

En suspension af 30,5 g (0,05 mol) His(Z)-Phe-OMe-2HBr (II) og 21,7 g (0,05 mol) Z-His(Z)-OH i 500 ml CH₂Cl₂ afkøles til 0°C. Derpå tilsættes 11 g DCC og 10,1 g (0,10 mol) triethylamin, og blandingen henstilles ved stuetemperatur natten over.

Det dannede dicyclohexylurinstof frafiltreres, og filtratet koncentrerer til et glasagtigt materiale. Remanensen opløses i ethylacetat, og ethylacetatopløsningen vaskes med 10%'s citronsyre, H₂O, iskold 5%'s natriumhydrogencarbonatopløsning og H₂O. Ethylacetatopløsningen tørres over natriumsulfat og koncentrerer til ca. 1/3 af dets volumen, der tilsættes ether, indtil opløsningen bliver uklar, og opløsningen henstilles koldt. Der isoleres et hvidt fast stof. Udbytte: 29,5 g.

(d) L-Histidyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-methylester-trihydrochloridsalt (IV)

En blanding af 29 g $\begin{matrix} & Z & Z \\ & | & | \\ \text{Z-His-His-Phe-OMe} \end{matrix}$ (IV), 10,8 ml koncentreret HCl, 180 ml MeOH og to spatelfulde 10%'s Pd-C hydrogeneres i 5 timer under anvendelse af et Parr-hydrogeneringsapparat.

Efter filtrering koncentrerer methanolet til en olie, og der tilsættes ether til dannelse af et fast stof. 18 g råmateriale anvendes til den næste reaktion uden yderligere rensning.

(e) Tert.-butyloxycarbonyl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteinyl-L-histidyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-methylester (V)

13 g (0,038 mol) Boc-Cys(MBzl)-OH, 5,4 g (0,040 mol) hydroxybenztriazol og 8,3 g (0,040 mol) dicyclohexylcarbodiimid omrøres i 1 liter iskoldt methylenchlorid i 30 minutter. Der tilsættes 19,5 g (0,0345 mol) His-His-Phe-OMe-3HCl og 10,5 ml (0,096 mol) N-methyl-

morpholin, og blandingen omrøres natten over, efterhånden som den får stuetemperatur. Suspensionen filtreres til fjernelse af dicyclohexylurinstoffet, og filtratet vaskes successivt med vand, 10%'s H_2CO_3 og H_2O og tørres over Na_2SO_4 . Efter filtrering fjernes opløsningsmidlet i vakuum, hvorved der bliver 21,0 g råprodukt tilbage. Dette materiale omrøres i 100 ml acetonitril i 30 minutter ved stuetemperatur og filtreres. Bundfaldet vaskes med acetonitril og derpå med ether og tørres. Udbytte: 11 g.

Tyndtlagskromatografi: R_f 0,12, silicagel 60, $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3:\text{OH}:\text{HAc}$, 9:1:0,5, r/r.

Filtratet fra acetonitrilekstraktionen indeholder produkt og urenheder og kan anvendes til ekstraktion af andre råcharger.

(f) Tert.-butyloxycarbonyl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteinyll-L-histidyl-L-histidyl-L-phenylalanin (VI)

11,0 g (0,0142 mol) Boc-Cys(MBzl)-His-His-Phe-OMe opløses i 200 ml methanol, og der tilsættes 30 ml 1N kaliumhydroxid. Opløsningen omrøres ved stuetemperatur i 2 timer, og methanolet fjernes i vakuum. Remanensen fortyndes med 200 ml vand og filtreres. Filtratet indstilles på en pH-værdi på 5 med 10%'s citronsyre, og det gummiagtige bundfald henstilles, efterhånden som det krystalliserer. Produktet filtreres, vaskes med vand og tørres i vakuum over P_2O_5 . Udbytte: 7,3 g (67%).

Tyndtlagskromatografi: R_f 0,52, silicagel 60, n-butanol:ethylacetat:eddikesyre: H_2O , 1:1:1:1, r/r, R_f 0,43, silicagel 60, tert.-amylalkohol:pyridin: H_2O , 7:6:7, r/r.

(g) N-Tert.-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyll-L-phenylalanin-methylester (VII)

En opløsning af 61,8 g (0,2 mol) Boc-L-Thr(Bzl)-OH og 22,4 ml (0,2 mol) N-methylmorpholin i THF afkøles til -15°C . Der tilsættes portionsvis 26,2 ml (0,2 mol) isobutylchlorformiat, idet temperaturen holdes på $-15 - -10^\circ\text{C}$. Efter omrøring ved -15°C i 15 minutter tilsættes portionsvis en kold blanding af 43,1 g (0,2 mol) L-Phe-OMe-HCl og 22,4 ml (0,2 mol) N-methylmorpholin i DMF, idet temperaturen holdes på $-10 - -5^\circ\text{C}$. Blandingen omrøres ved 0°C i 2 timer og derpå ved stuetemperatur natten over. Den filtrerede reaktionsblanding koncentrerer i vakuum, og remanensen optages i ethylacetat. Ethylacetatopløsningen vaskes fortløbende med 5%'s KHSO_4 , 5%'s KHCO_3 og salt-

opløsning og tørres over Na_2SO_4 . Efter koncentration i vakuum fås en olie, som krystalliserer ved henstand. Det faste stof omkrystalliseres fra isopropylether:hexan. Udbytte: 74,9 g (80%). Smp. $78-81^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{24} + 10,75$ (c 1,023, MeOH), R_f (CHCl_3) 0,35.

Analyse for $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6$: (470,55)

	<u>C%</u>	<u>H%</u>	<u>N%</u>
Beregnet:	66,36	7,28	5,95
Fundet:	66,72	7,32	5,85

(h) N-Tert.-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonin-L-phenylalanin (VIII)

23,5 g (0,05 mol) Boc-Thr(Bzl)-Phe-OMe opløses i en blanding af 100 ml MeOH:dioxan (1:1) og behandles med 55 ml 1N NaOH i 3 timer, indtil udgangsmaterialet ikke kan påvises ved tyndtlagskromatografi. Det meste af opløsningsmidlet inddampes i vakuum, og remanensen fortyndes med vand, hvorpå den syrnes med 5%'s citronsyre. Det udskilte gummiagtige stof optages i EtOAc og vaskes med vand (saltopløsning), hvorpå det inddampes til tørhed. Remanensen krystalliseres fra Et_2O :hexan. Udbytte 19,8 g (87%). Smp. $118-119^\circ\text{C}$.

(i) N-Tert.-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin-methylester (IX)

30,9 g (0,1 mol) N-tert.-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonin opløses i 200 ml tørt tetrahydrofuran, afkøles ved -20°C og behandles med 11 ml N-methylmorpholin og derpå med 13,4 ml isobutylchlorformiat. Den kolde reaktionsblanding omrøres i 5 minutter ved -20°C , hvorpå den behandles med en opløsning af O-benzyl-L-serin-methylester og 25 g (ca. 0,1 mol) hydrogenchlorid indeholdende 11 ml N-methylmorpholin i DME, og blandingen henstilles natten over for at få stuetemperatur.

Opløsningsmidlet fjernes i vakuum, og remanensen fordeles imellem vand og ethylacetat. Den organiske fase vaskes med 5%'s citronsyre, vand, vandigt KHCO_3 og vand og tørres over MgSO_4 , hvorpå den inddampes til tørhed, hvorved fås en olieformig remanens, som krystalliserer fra diethylether:hexan til et geléagtigt fast stof. Udbytte: 29 g.

R_f (CHCl_3 :MeOH, 25:1) 0,85, R_f (EtOAc:hexan, 1:1) 0,65.

(j) N-Tert.-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-serin (X)

28,2 g (0,0563 mol) Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-OMe opløses i ca. 50 ml methanol og behandles med 75 ml 1 N natriumhydroxid i 1,5 timer ved stuetemperatur. Den alkaliske opløsning neutraliseres til en pH-værdi på 7 med 10%'s citronsyre, og størstedelen af methanolet fjernes i vakuum. Remanensen fortyndes med noget vand og syrnes med 5%'s vandigt KHSO_4 , hvorpå den ekstraheres med EtOAc. Den organiske fase vaskes med H_2O , tørres over Na_2SO_4 og inddampes til tørhed til en olie. Udbytte: kvantitativt.

R_f (EtOAc:hexan, 1:1) 0,15 (lang plet).

(k) N-Tert.-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-p-methoxybenzyl-L-cystein-benzylester (XI)

24,3 g (50 mmol) Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-OH opløses i 250 ml acetonitril og dichlormethan (2:3) og blandes med 25 g (50 mmol) HCys-(SMBzl)-Bzl-TosOH, derpå med 6,8 ml triethylamin og 6,8 g N-hydroxybenzotriazol, og blandingen afkøles i isbad.

Der tilsættes en opløsning af 11 g DCC (53 mmol) i 50 ml acetonitril, og reaktionsblandingen omrøres koldt i 2 timer og derpå i 2 dage ved stuetemperatur. Det udskilte DCU frafiltreres, og filtratet indampes til tørhed. Den olieformige remanens fordeles imellem ethylacetat og vand, og den organiske fase vaskes med 10%'s citronsyre, vand, 5%'s KHCO_3 og saltopløsning og tørres over Na_2SO_4 . Opløsningsmidlet indampes, og den olieformige remanens krystalliseres fra Et_2O :hexan, hvorved fås et hvidt fast stof i en mængde på 24,5 g, smp. $87-90^\circ\text{C}$.

R_f (chloroform:methanol, 25:1) 0,54, spor ved 0,4 og 0,3 (heptan:EtOAc, 1:1) 0,64, spor ved 0,25, I_2 positiv $[\alpha]_D^{25} -14,7$ (C 0,98, DMF).

Elementæranalyse for $\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{SO}_9$: (798,9)

	<u>C%</u>	<u>H%</u>	<u>N%</u>
Beregnet:	66,15	6,56	5,26
Fundet:	66,22	6,95	5,29

(l) O-Benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-p-methoxybenzyl-L-cystein-
-benzylester-trifluoracetat (XII)

8 g (10 mmol) Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(SMBzl)-OBzl blandes med 100 mmol anisol og behandles med 100 ml TFA i 45 minutter. Opløsningsmidlet indampes i vakuum, og remanensen opløses i tørt Et₂O, hvorpå den indampes til tørhed i højvakuum, hvorved fås en olieformig forbindelse i en mængde på 7,2 g (90%).

R_f (n-butanol:vand:iseddike, 4:1:1) 0,9, R_f (heptan:EtOAc) 0,0-0,1 lang plet, I₂ positiv og nihydrin positiv.

(m) N-Tert.-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-
-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-p-methoxy-benzyl-L-cystein-
-benzylester (XIII)

9,2 g (20 mmol) Boc-Thr(Bzl)-Phe-OH fremstillet ved den i eksempel (c) angivne fremgangsmåde opløses i 100 ml DFM og blandes med 3,4 g N-hydroxysuccinimid og en opløsning af Thr(Bzl)Ser(Bzl)-Cys(SMBzl)OBzl-TFA-salt (20 mmol) i 20 ml DMF neutraliseret med triethylamin til en pH-værdi på 7. Blandingen afkøles i isbad og behandles med 4,5 g DCC i 2 timer under kulde og derpå i 2 dage ved stuetemperatur. DCU filtreres, og filtratet indampes til tørhed. Remanensen finsønderdeles med vand til dannelse af et bundfald, som optages i EtOAc, vaskes med 5%'s citronsyre, vand, 5%'s Na₂CO₃ og vand, tørres over Na₂SO₄ og indampes til tørhed. Remanensen bringes til at størkne fra Et₂O:hexan og kan krystalliseres fra MeOH (letopløselig i CHCl₃). Udbytte: 17,3 g (70%). Smp. 105-107°C.

R_f (CHCl₃:MeOH, 10:1) 0,90, [α]_D²⁵ -3,6 (C 1, DMF).

Analyse for C₆₄H₇₅N₅SO₁₂H₂O: (1156,2)

	<u>C%</u>	<u>H%</u>	<u>N%</u>
Beregnet:	66,46	6,71	6,05
Fundet:	66,68	6,59	6,20

(n) Tert.-butyloxycarbonyl-D-tryptophyl-N^ε-benzyloxycarbonyl-L-lysyl-methylester (XIV)

30,4 g (0,1 mol) Boc-D-Trp-OH, 33 g (0,1 mol) Lys(Z)-OMe-HCl og 13,6 ml triethylamin opløses i 400 ml DMF og afkøles i isbad, derpå tilsættes 22 g dicyclohexylcarbodiimid, og blandingen henstilles natten over ved stuetemperatur. Det udskilte dicyclohexylurinstof filtreres, filtratet koncentrerer til et lille volumen, og derpå tilsættes rigeligt med vand til dannelse af et gummiagtigt materiale. Dette materiale optages i ethylacetat og vaskes med 10%'s vandig citronsyre, H₂O, mættet NaHCO₃ og H₂O, tørres over Na₂SO₄ og indampes til tørhed. Remanensen finsønderdeles med ether og derpå med hexan, hvorved fås et krystallinsk fast stof i en mængde på 28 g.

Tyndtlagskromatografi: silicagel G, hexan:EtOAc, 1:1, r/r, R_f 0,3.

(o) Tert.-butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-N^ε-benzyloxycarbonyl-L-lysine (XV)

A. 22 g (44 mmol) Boc-D-Trp-Lys(Z)-OMe sættes til en i forvejen afkølet blanding af 220 ml TFA og 25 ml anisol, og blandingen omrøres i isbad i 30 minutter. TFA indampes så hurtigt som muligt ved 27°C på en rotationsfordamper, og den resterende olie finsønderdeles flere gange med en opløsning af hexan:ether (2:1), dekanteres og pumpes sluttelig til et gummiagtigt stof. Udbytte 21,3 g (36 mmol).

B. 9,6 g (36 mmol) Boc-Phe-OH, 5,3 g (39 mmol) HOBt og 8 g (39 mmol) DCC omrøres i 500 ml koldt dichlormethan i 20 minutter. Der tilsættes 21,3 g (36 mmol) D-Trp-Lys(Z)-OMe-TFA-salt i 2000 ml dichlormethan og derpå 4,25 ml (39 mmol) N-methylmorpholin. Reaktionsblandingen omrøres natten over, efterhånden som den får stuetemperatur. Blandingen filtreres til fjernelse af DCC, og filtratet vaskes med 2 x H₂O, 2 x 10%'s citronsyre, 2 x mættet NaHCO₃ og 2 x vand og tørres over Na₂SO₄. Efter filtrering og indampning fås remanensen i en mængde på 21,4 g (82%), der kan anvendes uden yderligere rensning.

Tyndtlagskromatografi: silicagel F-254/CHCl₃ 9:CH₃OH 1:HAc 0,5, R_f 0,76 samt spor af mindre urenheder.

C. 22,9 g (31,4 mmol) Boc-Phe-D-Trp-Lys(Z)-OMe opløses i 450 ml p-dioxan og 100 ml methanol, der tilsættes 39 ml vandigt 1N KOH, og blandingen omrøres natten over ved stuetemperatur. Opløsningen indampes på en rotationsfordamper. Resanen opløses i 500 ml varmt vand, syres til en pH-værdi på 3 med 10% 's citronsyre, omrøres i 30 minutter og filtreres. Efter tørring i vakuum natten over fås et udbytte på 21,6 g (96%). Smp. 85-90°C. $[\alpha]_D^{26} = +7,09$ c, 0,987 MeOH. R_f 0,63 CHCl_3 , 9:CH₃OH, 1:HAc, 0,5, silicagel F-254.

(p) Tert.-butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-N^ε-benzyloxy-carbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteiny-l-benzylester (XVI)

A. 40,5 g (35 mmol) Boc-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(SMBzl)-OBzl (XIII) sættes til en kold opløsning af 400 ml TFA og 40 ml anisol, og blandingen omrøres i kold tilstand i 30 minutter. TFA indampes på en rotationsfordamper, og resanen finsønderdeles med 1 liter ether:hexan (1:1) til et hvidt pulver. Efter filtrering, vaskning med ether:hexan og tørring i vakuum over P₂O₅ og NaOH-kugler fås et udbytte på 34,6 g (82%). Smp. 136-139°C, blødgøres ved 120°C. $[\alpha]_D^{26} = -9,93$ c, 1,04 MeOH. R_f 0,63 silicagel CHCl_3 , 9:CH₃OH, 1:HAc, 0,05 lille mere polar urenhed. R_f 0,53.

B. 20,0 g (27,9 mmol) Boc-Phe-D-Trp-Lys(Z)-OH, 4,15 g (30,8 mmol) HOBt og 6,3 g (30,8 mmol) DCC omrøres i 2,0 liter koldt dichlormethan i isbad i 30 minutter. Der tilsættes 32,6 g (27,9 mol) H-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(SMBzl)-OBzl-TFA-salt og derpå 3,35 ml (30,8 mmol) N-methylmorpholin, og omrøringen fortsættes natten over, efterhånden som blandingen opvarmes til stuetemperatur. Tyndtlagskromatografi viser, at reaktionen praktisk taget er afsluttet efter 2 timer.

Blandingens filtreres, og filtratet vaskes med vand, 10% 's citronsyre, vand, mættet NaHCO₃ og vand og tørres. Efter filtrering og indampning viser tyndtlagskromatografi produkt og en mere polar urenhed, som fjernes ved, at råproduktet opløses i 200 ml varmt DMF, og der tilsættes 1 liter 2% 's vandigt NaHCO₃. Produktet filtreres, vaskes med fortyndet NaHCO₃ og vand og tørres i vakuum over P₂O₅. Udbytte: 36,5 g (75%). Smp. 182-184°C (svinder ved 150°C). $[\alpha]_D^{26} = 0$ c, 0,988

CHCl_3 . R_f (enkelt plet) 0,76, silicagel CHCl_3 , 9: CH_3OH , 1: HAc , 0,05.

(q) H-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(SMBzl)-OBzl-trifluoracetatsalt (XVII)

32 g Boc-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(SMBzl)-OBzl og 33 ml anisol opløses i 50 ml dichlormethan, der tilsettes 100 ml trifluoreddikesyre, og blandingen omrøres i 30 minutter ved stuetemperatur. Opløsningen indampes på en rotationsfordamper ved 30°C . Remanensen finsønderdeles med vandfrit ether til et pulver, som filtreres, vaskes med ether og tørres i vakuum over P_2O_5 og natriumhydroxidperler.

Tyndtlagskromatografi på silicagel 60 i $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HOAc}$ (9:1:0:5) viser en enkelt plet. $R_f = 0,65$. Kernemagnetresonansspektroskopi (HNMR) viser ingen top for tert.butyl.

(r) Tert.-butyloxycarbonyl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteinyl-L-histidyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-N ϵ -benzyloxycarbonyl-L-lysyl-O-benzyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-O-benzyl-L-threonyl-O-benzyl-L-seryl-S-p-methoxybenzyl-L-cystein-benzylester (XVIII)

5,5 g (7,2 mmol) Boc-Cys(SMBzl)-His-His-PheOH, 1,07 g (7,9 mmol) 1-hydroxy-benzotriazol-monohydrat og 1,65 g (7,9 mmol) dicyclohexylcarbodiimid omrøres i 100 ml tørt dimethylformamid i isbad i 30 minutter. Der tilsættes 12,5 g (7,2 mmol) H-Phe-D-Trp-Lys(z)-Thr(Bzl)-Phe-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(SMBzl)OBzl-trifluoracetatsalt og 0,855 g (7,65 mmol) N-methylmorpholin, og blandingen henstilles til opnåelse af stuetemperatur natten over med omrøring. Suspensionen filtreres til fjernelse af dicyclohexylurinstof, og filtratet indampes til 50 ml og fortyndes med 500 ml mættet vandig natriumhydrogencarbonatopløsning. Det fremkomne faste stof filtreres, vaskes med vand og opløses på ny i 200 ml DMF. Opløsningen fortyndes med 1 liter 5%'s vandig citronsyre og filtreres. Det faste stof vaskes med vand, opløses i 200 ml DMF og udfældes med 1 liter mættet natriumhydrogencarbonatopløsning, filtreres, vaskes med vand og tørres i vakuum over P_2O_5 ved stuetemperatur. Udbytte: 15 g.

Aminosyreanalyse: His 1,66(2,0), Lys 1,05(1,0), Phe (3,0),
Ser 1,02(1,0), Thr 2,2 (2,0).

(s) L-Cysteiny-L-histidyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-
-D-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-
-L-cystein-cyclisk (1-12) disulfid (XIX)

5 g Boc-Cys(SMBzl)-His-His-Phe-Phe-D-Trp-Lys(z)-Thr(Bzl)-Phe-
 -Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Cys(SMBzl)OBzl blandes med 10 ml anisol og be-
 handles med 100 ml flydende HF under udelukkelse af luft og i isbad
 i 60 minutter. Overskydende HF fjernes i vakuum, og remanensen op-
 tages i 10%'s vandig eddikesyre (200 ml) og hældes i 7 liter afluftet
 vand. pH-Værdien indstilles på 7 med fortyndet NH_4OH og omrøres i fri
 luft i 24 timer, pH-værdien indstilles på 5 med iseddike, og opløs-
 ningerne ledes igennem en "Amberlite"[®]-CG-50-søjle (H^4 -form). Peptid-
 materialet, som absorberes på ionbytterharpiksen, fortyndes med 50%'s
 vandig eddikesyre, og fraktionerne indeholdende peptidmaterialet hæl-
 des sammen og lyofiliseres, hvorved fås 2 g af råmaterialet. Dette
 rådecapeptid renses ved søjlekromatografi ved hjælp af "Sephadex"[®]
 G 25 og elueringer med 10%'s vandig eddikesyre og fordelingskromatogra-
 fi ved hjælp af "Sephadex" G 25 med tofasesystemet N-BuOH:vand:-
 iseddike, 4:5:1, r/r.

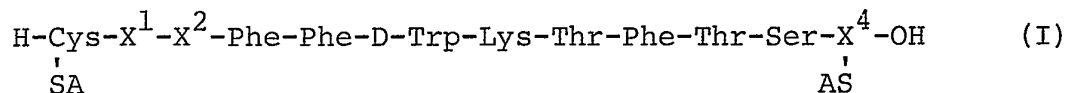
Tyndtlagskromatografi: silicagel (A.G. Merck), chlorpeptidspray,
 jf. D.E. Nitecki et al. Biochem. 5, 665 (1966).

R_f (BWA, 4:1:1) 0,45, R_f (BWAP, 30:24:6:20) 0,64.

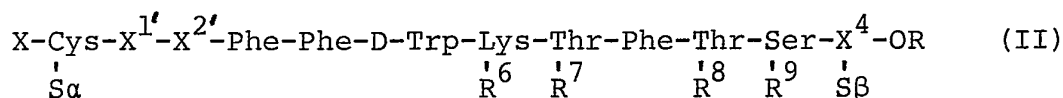
Aminosyreanalyse: Thr(2) 1,85, Ser(1) 0,79, Phe(3) 3, Lys(1)
 1,02, His(2) 1,75, Cys, Trp ND.

P A T E N T K R A V.

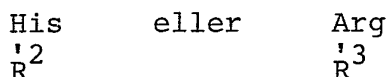
1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af somatostatinanaloge med den almene formel



hvor A er hydrogen, eller begge A'er tilsammen repræsenterer en S-S-binding, X^1 betyder His eller Arg, X^2 betyder His eller Glu, og X^4 betyder Cys eller D-Cys, eller farmaceutisk acceptable salte deraf, k e n d e t e g n e t ved, at forbindelser med formlen



hvor R betyder en carboxybeskyttelsesgruppe eller en polystyrenharpiksbærer bundet via en methylen gruppe, X er H eller en α -amino beskyttelsesgruppe, $X^{1'}$ betyder



hvor R^3 betyder en beskyttelsesgruppe for sidekædenitrogenatomerne i arginin, og R^2 betyder hydrogen eller en beskyttelsesgruppe for imidazolnitrogenatomet i histidin; $X^{2'}$ betyder



hvor R^2 har den ovenfor angivne betydning, eller $X^{2'}$ betyder



hvor R^4 betyder en beskyttelsesgruppe for sidekædecarboxygruppen i glutaminsyre; R^6 betyder en beskyttelsesgruppe for sidekædeaminogruppen i lysin, R^7 , R^8 og R^9 hver især betyder beskyttelsesgrupper for hydroxylgrupperne i threonin og serin, X^4 er som ovenfor anført, og α og β betyder hydrogenatomer, sulfhydrylbeskyttelsesgrupper eller tilsammen udgør en direkte binding imellem svovl-atomerne, befries for alle beskyttelsesgrupper og fjernes fra den eventuelle polystyrenharpiksbærer, og om nødvendigt oxideres til dannelse af en direkte S-S-binding, og om nødvendigt produktet isoleres som den frie base eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en polystyrenharpiksbærer og beskyttelsesgrupperne fjernes i ét enkelt trin ved behandling med hydrogenfluorid i nærværelse af anisol.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at oxidationen gennemføres ved anvendelse af oxygen eller kaliumferricyanid.

4. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at R^2 betyder tosyl, benzyloxycarbonyl, adamantyloxycarbonyl eller tert.butyloxycarbonyl.

5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at R^3 betyder nitro, tosyl, benzyl-oxycarbonyl, adamantyloxycarbonyl eller tert.butyloxycarbonyl.

6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at R^4 betyder benzyl.

7. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at R^6 betyder tosyl, tert.amyloxy-carbonyl, tert.butyloxycarbonyl, diisopropyloxycarbonyl, benzyl-oxycarbonyl, halogenbenzyloxycarbonyl eller nitrobenzyloxycarbonyl.

8. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at mindst en af R^7 , R^8 og R^9 betyder acetyl, benzoyl, tert.butyl eller benzyl.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgninger nr. 1404/75, 885/76, 3515/76
Biochem.Biophys.Res.Comm., bind 65, nr. 2 (1975), side 746-751.