(19) DANMARK

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(12) **PATENTSKRIFT** (11) **170820 B1**

(21) Patentansøgning nr.: 1370/85
(22) Indleveringsdag: 26 mar 1985
(41) Alm. tilgængelig: 28 sep 1985
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 29 jan 1996
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 27 mar 1984 DE 3411224

(51) Int.Cl.6 C 07 K 5/097
C 07 K 7/06

(73) Patenthaver: *HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Brueningstrasse 45; 6230 Frankfurt am Main 80, DE
(72) Opfinder: Rainer *Uhmann; DE, Kurt *Radscheit; DE

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Fremgangsmåde og tripeptid til fremstilling af racematfattige peptider

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1370-85

Peptider med formel (I)

$$U - A^1 - A^2 - A^3 - A^4 - A^5 - X \qquad (I)$$

hvor U er en urethanbeskyttelsesgruppe, A^1 er Trp eller D-Trp, A^2 er Ser, Ala eller Thr, A^3 er Tyr eller Phe, A^4 er Gly eller en rest af en D-aminosyre eller et derivat deraf, A^5 er Leu, N-methyl-Leu, N-ethyl-Leu, Ser(Bu^t), Cys(Bu^t), Asp(OBu^t), Glu(OBu^t), Orn(Boc) eller Lys(Boc), X er OBut eller A^6-Pro-Y, A^6 er Arg, Orn, Lys eller homoarginin, og Y er Gly-NH_2, NH-NH-CO-NH_2, alkylamino, cyclopropylamino eller OH- eller F-substitueret alkylamino eller cycloalkylamino, fremstilles ved omsætning af et tripeptid med formel (II)

$$U - A^1 - A^2 - A^3 - OH \qquad (II)$$

med et peptid med formel (III)

fortsættes

DK 170820 B1

$$H - A^4 - A^5 - X \qquad \text{(III)}$$

Fremgangsmåden giver praktisk taget racematfrie produkter med formel (I), og den er problemfri såvel ud fra praktisk-kemiske synspunkter som ud fra sikkerheds- og miljømæssige synspunkter. Derfor kan den gennemføres i stor målestok.

Tripeptiderne med formel (II) er hidtil ukendte mellemprodukter.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af peptider med den almene formel (I)

$$U - A^1 - A^2 - A^3 - A^4 - A^5 - X \qquad (I)$$

hvor
U er en urethanbeskyttelsesgruppe,
A^1 er Trp eller D-Trp,
A^2 er Ser, Ala eller Thr,
A^3 er Tyr eller Phe,
A^4 er Gly, en rest af en D-aminosyre eller en rest af et D-aminosyrederivat,
A^5 er Leu, N-methyl-Leu, N-ethyl-Leu, Ser(Bu^t), Cys(Bu^t), Asp(OBu^t), Glu(OBu^t), Orn(Boc) eller Lys(Boc), og
X er OBu^t eller A^6-Pro-Y,
idet A^6 står for Arg, Orn, Lys eller homoarginin, og
Y står for Gly-NH_2, NH-NH-CO-NH_2, (C_1-C_3)-alkylamino, cyclopropylamino, med hydroxy eller fluor substitueret (C_1-C_3)-alkylamino eller med hydroxy eller fluor substitueret cycloalkylamino, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man omsætter et tripeptid med den almene formel (II)

$$U - A^1 - A^2 - A^3 - OH \qquad (II)$$

hvor
U, A^1, A^2 og A^3 er som defineret ovenfor, med et peptid med den almene formel (III)

$$H - A^4 - A^5 - X \qquad (III)$$

hvor A^4, A^5 og X er som defineret ovenfor.

Peptider med den almene formel (I) er mellemprodukter ved syntesen af gonadorelin (Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 (1971) 1334-1339) eller analoge deraf, som f.eks. er kendt fra US-patentskrift nr. 4.024.248.

Gonadorelin (LHRH) er som bekendt et hormon fra hypothalamus med formel (IV)

Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 (IV)

som i hypofysen udløser de gonadotrope hormoner LH og FSH. I betragtning som gonadorelin (LHRH)-analoge kommer peptider, hvor enkelte eller flere aminosyrer i LHRH er byttet ud, og/eller hvor peptidkæden er varieret ved forkortning, forlængelse og/eller derivatisering. Af særlig betydning er derved substitutioner af glycin i stilling 6 med D-aminosyrer og i stilling 10 med grupper som alkylamino. Der skal f.eks. nævnes buserelin med formel (V)

Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt (V)

Fra litteraturen kendes fremgangsmåder til fremstilling af forbindelser med formel (I) (Biochem. Biophys. Res. Commun. 45 (1971), 767; US-patentskrift nr. 4.024.248), hvor syntesen altid sker ifølge azidmetoden, der er kendt som en fremgangsmåde med ringe racemisering ved sådanne fragmentsynteser (J. Chem. Soc. (London) 1960, 3902; Helv. Chim. Acta, 44 (1961), 1991).

Dog skal der ved anvendelsen af azidsyntesen regnes med talrige sidereaktioner. Således kan 1,2-diacyl--hydraziner opstå, først og fremmest, hvis syreunderskud er fremherskende under aziddannelsen.

Ved tyrosin i det foreliggende tilfælde kan forekomme nitrering i o-stilling til den phenoliske hydroxygruppe,

og ved tryptophan kan forekomme N-nitrosering. Også omdannelsen af peptidazider til de tilsvarende amider er blevet iagttaget (sammenfattende litteratur: Liebigs Ann., 659 (1962) 168, Synthesis (1974) 549).

En graverende mangel er instabiliteten af peptidaziderne, som allerede ved en let forhøjet temperatur ved en Curtius-nedbrydning kan omlejres til isocyanater og som følge deraf danne urinstoffer og andre biprodukter (Helv. Chim. Acta, 44 (1961), 1991, side 1997, Synthesis (1974) 549).

Under efterbearbejdningen kan ligeledes iagttages denne sidereaktion under dannelse af isocyanatet og viderereaktion til urinstof (se eksempel 4.1 og 4.2). Biproduktet (urinstofderivat) er meget vanskeligt at skille fra det tilsvarende peptid og kan kun påvises ved hjælp af HPLC. Omfanget af denne sidereaktion kan andrage indtil 15% (se eksempel 4.2).

Udbyttet af azidsyntesen er sjældent højere end 70-80% af teorien. Årsag dertil er de nævnte sidereaktioner.

Azidfremgangsmåden er ubrugelig set ud fra et produktionsmålestokssynspunkt. Det under fremgangsmåden optrædende hydrogenazid eller dets salte udgør imidlertid over en bestemt mængde en teknisk svært overvindelig sikkerhedsrisiko. Således optræder f.eks. ved omsætning af ca. 25 kg tripeptidazid i løbet af oparbejdningen f.eks. ved en sur ekstraktion mindst 1 kg hydrogenazid der kan føre til kraftige eksplosioner (Römpps Chemie Lexikon, 7. oplag. Frankh'sche Verlagshandlung, Stuttgart 1975, side 3348).

For at beherske denne risiko skal der udvikles og installeres talrige dyre måletekniske proceskontrolsystemer. Desuden skal modervæsker og vandige ekstraktionsopløsninger før deres bortskaffelse befries for hydrogenazid og dets salte, hvilket ligeledes kræver en større analytisk indsats.

Hydrogenazidet må desuden med hensyn til aspektet arbejdshygiene betragtes som betænkeligt; dette udtrykkes ved en meget lav MAK-værdi. MAK-værdien for NH_3 andrager 0,1 ml/m^3 henholdsvis 0,27 mg/m^3 (TRgA 900, 1982).

Disse kendte grunde forbyder en forstørrelse af azidfremgangsmåden udover laberatoriemålestokken.

Det har nu vist sig, at man ved at gå ud fra det ved metoden med ringe racemisering fremstillede, beskyttede tripeptid med formel (II) ved hjælp af de fem nedennævnte koblingsfremgangsmåder på overraskende praktisk måde kommer frem til racematfri produkter med formel (I).

Den her omhandlede fremgangsmåde f.eks. under anvendelse af PPA-metoden har i modsætning til azidfremgangsmåden ingen sikkerhedstekniske begrænsninger. Derudover har fremgangsmåden ud fra det praktisk-kemiske standpunkt ligeledes vist sig at være problemløs. Overgangen til produktionsmålestok fører hverken til tab i udbyttet eller renhed af produkterne i forhold til laboratoriemålestokken (se eksempel 6.1).

Omsætningen af tripeptid med formel (II) med det tilhørende peptid med formel (III) med en fri aminogruppe og en beskyttet carboxylgruppe udføres fortrinsvis i et i peptidkemien gængs opløsningsmiddel eller også i vand/opløsningsmiddelblandinger i nærværelse af et egnet kondensationsmiddel, som f.eks.

1. Dicyclohexylcarbodiimid under tilsætning af 1-hydroxybenzotriazol (DCCI/HOBt-metode, Chem. Ber. 103 (1970), 788).
2. Dicyclohexylcarbodiimid under tilsætning af 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (DCCI/HOOBt-metode, Chem. Ber. 103 (1970), 2034).

3. Dicyclohexylcarbodiimid under tilsætning af N-hydroxysuccinimid (DCCI/HONSu-metode, Z. Naturforsch. 21b (1966), 426).
4. Alkanphosphonsyreanhydrid, såsom n-propylphosphonsyreanhydrid (PPA-metode, Angew. Chemie, Int. Ed. 19 (1980), 133).
5. Dialkylphosphinsyreanhydrid, såsom methylethylphosphinsyreanhydrid (MEPA-metode, US-patentskrift nr. 4.426.325).

Hvis aminosyren i stilling 6 i den gonadorelinanalog, der skal syntetiseres, skal være et syrelabilt aminosyrederivat, såsom f.eks. D-Ser(Bu^t), D-Glu(Bu^t), L-Lys(Boc), er mellemproduktet med formel (I), hvor X er lig OBu^t ikke hensigtsmæssigt; syntesevejen må så føre over mellemprodukter med formel (I), hvor X ≠ OBu^t.

Som egnede opløsningsmidler anvender man ved den her omhandlede fremgangsmåde af opløselighedsgrunde for det meste polære opløsningsmidler, som f.eks. dimethylacetamid, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, phosphorsyre-tris-(dimethylamid), N-methylpyrrolidon, vand eller blandinger af de nævnte opløsningsmidler med vand. Sidstnævnte gælder først og fremmest for MEPA-fremgangsmåden. Imidlertid kommer også chloroform, methylenchlorid eller ethylacetat til anvendelse. Syntesen kan gennemføres mellem -10°C og stuetemperatur. Fortrinsvis begynder man ved ca. 0°C og forhøjer senere til stuetemperatur.

En foretrukket fremgangsmådevariant er ejendommelig ved, at
A^1 betyder Trp, A^2 betyder Ser, A^3 betyder Tyr, A^4 betyder Gly, D-Ala, D-Leu, D-Ser(Bu^t), D-Trp, D-Phe, D-Gln(cyclohexyl), D-naphthylalanin, D-benzylhistidin, D-Thr(Bu^t), D-Cys(Bu^t), D-Asp(OBu^t), D-Glu(OBu^t), D-Orn(Boc) eller D-Lys(Boc), A^5 betyder Leu, og X betyder

OBu^t, Arg-Pro-NHC_2H_5, Arg-Pro-Gly-NH_2 eller Arg-Pro-NH--NH-CO-NH_2.

Særligt foretrukket er fremgangsmåder til fremstilling af U-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 og U-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHC_2H_5, hvor U er som defineret ovenfor.

Foretrukket er sådanne urethanbeskyttelsesgrupper U (se Kontakte Merck 3/79, side 14, 16), der er hydrogenolytisk fraspaltelige, såsom Z (dvs. benzyloxycarbonyl), Z(NO_2), Pyoc, Z(Hal_n), Dobz eller Moc, især Z.

Den overraskende lave racemiseringsgrad ved anvendelse af den her omhandlede fremgangsmåde er blevet bevist ved hjælp af højtryksvæskechromatografi (HPLC) på de ubeskyttede peptider med formel (I) (U = hydrogen). Fremstilles et tilsvarende hepta- eller octapeptid med formel (I) som beskrevet ovenfor, der i stilling A^3 har indbygget D-Tyr i stedet for Tyr, opnår man det produkt, som i tilfælde af en racemisering af forbindelsen med A^3 lig Tyr, må optræde under koblingen. Da disse to diastereomere kan adskilles som ubeskyttede peptider ved hjælp af HPLC, kan man således konstatere udstrækningen af racemiseringen ved de enkelte koblingsmetoder.

Tabel I Racemiseringsgrad

Eksempel: Z-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt

Syntesen af den nævnte forbindelse gennemføres ved hjælp af forskellige metoder, reaktionsproduktet underkastes i hvert tilfælde hydrogenering uden mellemrensning og karakteriseres som H-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt ved hjælp af HPLC.

HPLC-Metode

Søjle: "Nucleosil"® 5SA (4 x 300 mm), elueringsmiddel: 40% puffer/60% acetonitril (puffer: 1%'s KH_2PO_4, pH-værdi 5,8), strømning: 1 ml/min, detektor: UV - 220 nm.

Syntesemetode	Procentvise andel af D-isomeren[+)]
DCCI/HOBt	3 - 5
DCCI/HOOBt	1,5 - 2,5
DCCI/HONSu	1,5 - 2,5
PPA	1 - 2
MEPA	1,5 - 2,5
Azid	1 - 2

[+)] Retentionstiden for D-isomeren H-Trp-Ser-D-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt bestemmes efter målrettet fremstilling af forbindelsen ved hjælp af PPA-metoden.

Det er bemærkelsesværdigt, at udover det ringe omfang af racemisering ved anvendelse af PPA-metoden, er udbyttet og renheden af produkterne særligt høje.

Tabel II Sammenligning: renhed/udbytte

Eksempel: Z-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt

Reaktionsproduktet vejes efter isolering, derudfra beregnes det teoretiske udbytte, og ved hjælp af HPLC opstilles et relativt renhedskriterium.

HPLC-Metode

Søjle: "Nucleosil"® 5SA (4 x 300 mm), elueringsmiddel: 40% puffer/60% acetonitril (puffer: 1%'s KH_2PO_4, pH-værdi 5,8), strømning 1 ml/min, detektor: UV- 220 nm.

Syntesemetode	Udbytte (% af teori)	Renhed, flade-%[+)]
DCCI/HOBt	69	73
DCCI/HOOBt	72	75
DCCI/HONSu	75	77
PPA	85-88	80
MEPA	63	76
Azid	70-80	55

+) Relativt renhedskriterium ifølge HPLC; summen af spids-flader af alle UV-absorberende stoffer (ved 220 nm) i reaktionsproduktchromatogrammet sættes lig med 100. x flade-% tilfalder det ønskede stof (100%-metode).

Den foreliggende opfindelse angår endvidere tripeptider med den almene formel (II)

$$U - A^1 - A^2 - A^3 - OH \qquad (II)$$

hvor U, A^1, A^2 og A^3 er som defineret ovenfor, især

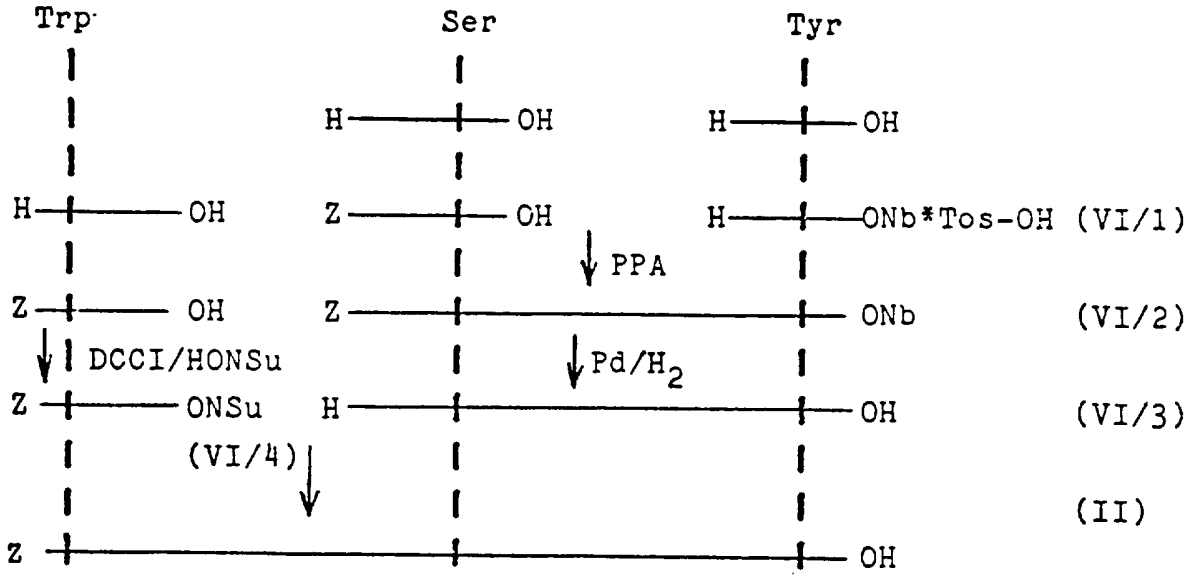
Z - Trp - Ser - Tyr - OH

Disse tripeptider fremstilles ved i peptidkemien gængs fragmentkondensation af peptidbrudstykker ifølge kondensationsskemaet (1-2) + 3 eller 1 + (2-3), hvorved andre funktionelle grupper eventuelt blokeres eventuelt intermediært med beskyttelsesgrupper, der er fraspaltelige i alkalisk eller surt medium.

Syntesen af tripeptiderne med formel (II) sker fortrinsvis på en måde med ringe racemisering, dvs. ved at undgå syntesetrin, der indeholder en forsæbningsreaktion,

som f.eks. den i efterfølgende skema beskrevne syntese af Z-Trp-Ser-Tyr-OH.

Skema



Forbindelserne II, VI/2 og VI/3 er ikke beskrevet i litteraturen. Forbindelse VI/1 fremstilles ifølge Shields, McGregor & Carpenter: J. Org. Chem., 26 (1961), 1941, og forbindelse VI/4 fremstilles ifølge E. Wünsch & K.H. Deimer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353 (1972), 1246.

Det har vist sig, at fremstillingsmåden (over VI/1 $\longrightarrow$VI/4) usædvanligt hurtigt og let fører til målet, idet de enkelte mellemtrin fremkommer krystallinske, med godt udbytte og høj renhed. Hydrogeneringstrinnet, der befrier dipeptidet for beskyttelsesgrupperne, er bemærkelsesværdig let at gennemføre (eksempel 5.2).

De anvendte forkortelser betyder:

Boc	=	tert.-butyloxycarbonyl
DCCI	=	dicyclohexylcarbodiimid
DMF	=	dimethylformamid
Et	=	ethyl
HOBt	=	1-hydroxybenzotriazol
HONSu	=	N-hydroxysuccinimid
HOOBt	=	3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin
MEPA	=	methylethylphosphinsyreanhydrid
ONb	=	p-nitrobenzylester
ONSu	=	N-hydroxysuccinimidester
OBu^t	=	tert.-butylester
PPA	=	n-propylphosphonsyreanhydrid
Bu^t	=	tert.-butylether
Tos-OH	=	p-toluensulfonsyre
Z	=	benzyloxycarbonyl
NEM	=	N-ethylmorpholin.

De efterfølgende eksempler skal belyse den her omhandlede fremgangsmåde samt fremstilling af de omhandlede mellemprodukter. En del af eksemplerne, nemlig eksemplerne nr. 1.6, 2.2, 4.1 og 4.2, beskriver sammenligningsforsøg med fremgangsmåder ifølge teknikkens stade.

Eksempel 1.1

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro--NHEt * Tos-OH med DCCI/HOBt

29,4 g (0,05 mol) Z-Trp-Ser-Tyr-OH, 44,7 g (0,05 mol) H-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt * 2 Tos-OH og 6,75 g 1-hydroxybenzotriazol opløses i 250 ml DMF, og opløsningen afkøles til +5°C. Til opløsningen sættes 6,4 ml N-ethylmorpholin og 11,3 g DCCI, og efter afsluttet tilsætning forhøjes temperaturen til ca. 20°C. Efter omrøring natten over frasuges fra det udfældede dicyclohexylurinstof, og filtratet inddampes til remanens. Denne optages i 600 ml butanol og ekstraheres 2 gange med en 5%'s sodaopløsning, hver gang med 150 ml, med 150 ml af en 13%'s kogsaltopløsning, 150 ml af 10%'s $KHSO_4$-opløsning og 150 ml af en 5%'s kogsaltopløsning. Den organiske fase koncentreres, filtreres fra det udfældede kogsalt, og 200 ml af den koncentrerede opløsning røres i 1,5 liter diisopropylether. Efter filtrering og vask med 200 ml diisopropylether tørres stoffet over P_2O_5 i vakuum.

Udbytte: 44,8 g (69% af teorien).

$[\alpha]_D^{22}$ = -31,6° (c = 1, dimethylacetamid).

Eksempel 1.2

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt * Tos-OH med DCCI/HOOBt

Der gås frem som beskrevet i eksempel 1.1, i stedet for 1-hydroxybenzotriazol anvendes imidlertid 8,15 g 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (HOOBt).

Udbytte: 46,7 g (72% af teorien).

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

Eksempel 1.3

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt * Tos-OH med DCCI/HONSu

Der gås frem som beskrevet i eksempel 1.1, i stedet for 1-hydroxybenzotriazol anvendes imidlertid 5,75 g N-hydroxysuccinimid (HONSu). Udbytte: 48,7 g (75 af teorien). $[\alpha]_D^{22} = -32^o$ (c = 1, dimethylacetamid).

Eksempel 1.4

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt * Tos-OH med PPA

I 65 ml DMF opløses 6,8 g (11,5 mmol) Z-Trp-Ser-Tyr--OH og 10,3 g (11,5 mmol) H-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt * 2 Tos-OH ved stuetemperatur, og opløsningen afkøles til $+5^oC$. Fra to dråbetragte tildryppes derefter samtidigt i løbet af 20 minutter 11,1 ml N-ethylmorpholin og 11,1 ml n-propylphosphonsyreanhydrid (50 vægt% i methylenchlorid). Reaktionsopløsningen omrøres natten over (ved stuetemperatur), koncentreres i vakuum til ca. 20 ml og optages i 150 ml n-butanol. Butanolopløsningen vaskes 2 gange med en 5%'s sodaopløsning, hver gang med 30 ml, med 30 ml af en 13%'s kogsaltopløsning, 150 ml af en 10%'s $KHSO_4$-opløsning og 150 ml af en 5%'s kogsaltopløsning, koncentreres i vakuum, filtreres fra det udfældede kogsalt, og den koncentrerede opløsning dryppes i ca. 250 ml diisopropylether. Efter filtrering og vask med 30-40 ml diisopropylether tørres stoffet over P_2O_5 i vakuum. Udbytte: 13,1 g (88% af teorien).

$[\alpha]_D^{22} = -33,7^o$ (c = 1, dimethylacetamid).

Eksempel 1.5

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt * Tos-OH med MEPA

I det væsentlige gås frem som beskrevet i eksempel 1.4 med undtagelse af følgende afvigelser:

De peptider, der skal kobles, opløses hver især i 30 ml DMF og vand. 2,3 g MEPA fortyndes i 5 ml DMF og tildryppes. Der indstilles en pH-værdi på 7,5 med ca. 3 ml N-ethylmorpholin. Udbytte: 9,4 g (63% af teorien).

$[\alpha]_D^{22} = -30,4^\circ$ (c = 1, dimethylacetamid).

Eksempel 1.6

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt *HCl ifølge azidfremgangsmåden

50 g (83 mmol) Z-Trp-Ser-Tyr-N_2H_3 opløses i 350 ml DMF, opløsningen afkøles til $-30^\circ C$, i løbet af 20 minutter får 45 ml 8 N HCl i dioxan lov til at løbe til, 12,5 ml t-butylnitrit (opløst i 100 ml dioxan) tildoseres i løbet af 20 minutter ved mindst $-20^\circ C$, derefter omrøres ved $-20^\circ C$ i 20 minutter, afkøles til $-30^\circ C$ og blandes med 45,7 ml N-ethylmorpholin. Til den således tilberedte azidopløsning sættes 55 g (61 mmol) H-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt * 2 Tos-OH, der er opløst i 150 ml DMF og blandet med 15,2 ml N-ethylmorpholin. Reaktionstemperaturen forøges til $5^\circ C$, og blandingen videreerøres i 20 timer.

Derefter fordeles reaktionsopløsningen mellem 400 ml n-butanol og 4 liter af en 25%'s kogsaltopløsning. Den vandige fase ekstraheres endnu tre gange med hver især 200 ml n-butanol, og de kombinerede organiske faser ekstraheres tre gange med hver især 200 ml af en 6,7%'s $KHSO_4$/3,3%'s K_2SO_4-opløsning. Efter ekstraktion med 200 ml af en 25%'s kogsaltopløsning sker ekstraktionen med 200 ml af en 5%'s bicarbonatopløsning. Butanolfasen inddampes i vakuum, og det endnu flydende koncentrat

indføres i 1 liter ethylacetat under kraftig omrøring. Det udfældede bundfald frafiltreres, vaskes med 200 ml ethylacetat og tørres i vakuum. Udbytte: 51,7 g (73% af teorien). $[\alpha]_D^{22}$ = -31,8° (c = 1 i methanol).

Eksempel 2.1

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 * Tos-OH med PPA

29,4 g (0,05 mol) Z-Trp-Ser-Tyr-OH og 42,08 g (0,05 mol) H-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 * 2 Tos-OH opløses i 200 ml DMF, opløsningen afkøles til ca. +5°C, og 48,6 ml NEM tilsættes. Derefter tildryppes i løbet af 20-30 minutter 47,3 ml PPA (50%'s i methylenchlorid), temperaturen af reaktionsblandingen bringes på stuetemperatur og omrøres natten over. Omsætningsovervågningen sker ved hjælp af DC-kontrol i løbemidlet butanol:iseddike:vand (3:1:1). Efter koncentration af opløsningen til ca. 100 ml optages den i 600 ml butanol og ekstraheres 2 gange med hver især 150 ml af en 5%'s sodaopløsning, med 150 ml af en 13%'s kogsaltopløsning, 150 ml af en 10%'s $KHSO_4$-opløsning og 150 ml af en 5%'s kogsaltopløsning. Den organiske fase koncentreres, filtreres fra det udfældede kogsalt, og den koncentrerede opløsning (200 ml) røres ind i 1,5 liter diisopropylether. Efter filtrering og vask med 200 ml diisopropylether tørres stoffet over P_2O_5 i vakuum. Udbytte: 55,2 g (89% af teorien).

$[\alpha]_D^{22}$ = -30,1° (c = 1, methanol).

Eksempel 2.2

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 * Tos-OH ifølge azidfremgangsmåden

57,7 g (95,8 mmol) Z-Trp-Ser-Tyr-N_2H_3 opløses i 400 ml DMF, opløsningen afkøles til -30°C, i løbet af 20 minutter tilsættes 43,5 ml 8N HCl i dioxan, 13,9 ml t-butylnitrit (opløst i 125 ml dioxan) tildoseres i løbet af 20 minutter ved mindst -20°C, derefter omrøres ved -20°C i 20 minutter, der afkøles til -30°C og blandes med 50 ml N-ethylmorpholin. Til azidopløsningen sættes 70 g (83 mmol) H-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 * 2 Tos-OH, der er opløst i 400 ml DMF og blandet med 30 ml N-ethylmorpholin. Reaktionstemperaturen forhøjes til +5°C, og blandingen omrøres videre i 20 timer.

Derefter fordeles reaktionsopløsningen mellem 400 ml n-butanol og 5 liter af en 25%'s kogsaltopløsning. Den vandige fase ekstraheres endnu to gange med hver gang 200 ml n-butanol, og de kombinerede organiske faser ekstraheres to gange med hver gang 250 ml af en 8%'s bicarbonatopløsning og fire gange med hver gang 150 ml af en 13%'s kogsaltopløsning. Butanolfasen tørres over natriumsulfat og filtreres. Derefter røres butanolopløsningen ind i 6 liter ethylacetat, det udfældede bundfald frafiltreres, vaskes med 500 ml ethylacetat og tørres i vakuum.

Udbytte: 73 g (71% af teorien). $[\alpha]_D^{22} = -31,8^\circ$ (c = 1, methanol).

Eksempel 3

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-OBu^t med PPA

58,9 g (0,1 mol) Z-Trp-Ser-Tyr-OH og 41,7 g (0,1 mol) H-Gly-Leu-OBu^t x Tos-OH opløses i 400 ml CH_2Cl_2, og opløsningen afkøles til 0 til 5°C. Fra to dråbetragte tildryppes samtidigt 96,5 ml N-ethylmorpholin og 96,5 ml n-propylphosphonsyreanhydridopløsning (50 vægt% i methylenchlorid) under afkøling i løbet af 20-30 minutter. Derefter opvarmes til stuetemperatur, og reaktionsopløsningen ekstraheres efter 3-20 timer 2 gange med hver gang 150 ml af en 5%'s sodaopløsning, med 150 ml af en 13%'s kogsaltopløsning, 150 ml af en 10%'s $KHSO_4$-opløsning og en 5%'s kogsaltopløsning. Methylenchloridfasen inddampes i vakuum, og den forblivende remanens krystalliseres fra ethylacetat/ligroin. Efter filtrering og vask med 100 ml ligroin tørres stoffet i vakuum. Udbytte: 70 g (86% af teorien). $[\alpha]_D^{22}$ = -25,8° (c = 1, methanol).

Eksempel 4.1

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-N_3

6 g (10 mmol) Z-Trp-Ser-Tyr-N_2H_3 opløses i 40 ml DMF, opløsningen afkøles til -30°C, 52,5 ml (42 mmol) 8 N HCl/dioxan tilsættes i løbet af 20 minutter, 1,4 ml t-butylnitrit (opløst i 12 ml dioxan) tildoseres i løbet af 20 minutter ved -20°C, der omrøres ved -20°C i 20 minutter, afkøles til -30°C og blandes med 5,3 ml N-ethylmorpholin. Den kolde opløsning indføres i 650 ml kold diethylether, og bundfaldet befries ved dekantering for ovenstående væske, omrøres på ny med kold ether og dekanteres. Remanensen optages i 40 ml methylenchlorid, ekstraheres 3 gange med ca. 25 g isvand, og opløsningen tørres over natriumsulfat. Indtil optagelse af IR-spektrerne opbevares den således opnåede opløsning i køleskab. Den friske opløsning viser i IR et skarpt bånd ved 4,7 µm, efter ca.

1 time opstår ved 4,5 µm et fornyet signal, som efter 24 timer er større end signalet ved 4,7 µm. Ifølge Schwyzer et al., Helv. chim. Acta, 44 (1961), 1991, skal denne iagttagelse tydes som en omlejring ifølge Curtius af et syreazid til det tilsvarende isocyanat.

Eksempel 4.2

Omsætning af en ældet azidopløsning med H-D-Ser(Bu^t)--Leu-Arg-Pro-NHEt * 2 Tos-OH

En ifølge eksempel 4.1 fremstillet opløsning oplagres 1 dag ved køleskabstemperatur og blandes med en opløsning af 5 g (5,6 mmol) H-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt * 2 Tos-OH i 15 ml DMF sammen med 1 ml N-ethylmorpholin og opbevares på ny ved +5°C natten over. Produktet isoleres ifølge oparbejdningsfremgangsmåden ifølge eksempel 1.6 og underkastes hydrogenering i en methanolisk opløsning i nærværelse af palladium på aktivt kul. Det efter hydrogenering opnåede reaktionsprodukt undersøges ved hjælp af HPLC (system: søjle: "Nucleosil"® 5SA (4 x 300 mm); elueringsmiddel: 40% puffer/60% acetonitril (puffer: 1%'s KH_2PO_4; pH-værdi 5,8), strømning: 1 ml/minut; detektor: UV - 220 nm). Derved viser der sig udover hovedproduktet H-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt med en retentionstid på ca. 25 minutter en yderligere intensiv biprodukttop med en retentionstid på ca. 30 minutter. En sammenlignende undersøgelse af de tilsvarende produkter, der er fremstillet ifølge eksempel 1.1-1.6, viser, at kun produktet ifølge eksempel 1.6 indeholder biprodukttoppen med en retentionstid på ca. 30 minutter på ca. 15 flade%, medens produkterne ifølge den her omhandlede, hidtil ukendte fremgangsmåde ikke indeholder denne bikomponent.

Åbenbart drejer det sig ved biproduktet med en retentionstid på ca. 30 minutter i HPLC om et urinstofderivat, der skal ses som følgeprodukt af den ifølge eksempel 4.1 iagttagede omlejring ifølge Curtius af azidet til isocyanatet.

Eksempel 5.1

Fremstilling af Z-Ser-Tyr-ONb

I en 4-halset kolbe på 4 liter opløses ved stuetemperatur i 1,8 liter dimethylformamid 244,0 g tyrosin-p--nitrobenzylester-toluensulfonat og 119,6 g benzyloxycarbonyl-serin, og opløsningen afkøles til 0-5°C. Ved ca. 5°C tildryppes 300,0 ml N-ethylmorpholin og i løbet af 20 minutter 275,0 ml af en propanphosphonsyreanhydrid/-methylenchloridopløsning.

Derefter forøges temperaturen i løbet af 1/2 time til stuetemperatur.

Efter ca. 4 timer påbegyndes destillering af DMF under vakuum (på en rotationsfordamper). Så snart destilleringen er afsluttet, opløses remanensen i ethylacetat og der udrøres med vand til en klar opløsning. pH-Værdien af den vandige fase skal andrage ca. 6. Ethylacetatfasen fraskilles i en skilletragt, den vandige fase omrøres på ny med ethylacetat, de to organiske faser kombineres, og den resterende vandige fase kastes bort efter DC-kontrol. Den organiske fase omrøres separat med en $KHSO_4$-opløsning og $NaHCO_3$-opløsning og vand og adskilles. Ethylacetatopløsningen inddampes i vakuum til tørhed, den olieagtige remanens omrøres med diethylether, hvorved olien gennemkrystalliserer. Produktet frasuges og tørres i vakuum. Udbytte: 17,48 g (65% af teorien). Smp. 202-208°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{22}$ = -13,2° (c = 1, dimethylacetamid).

Eksempel 5.2

Fremstilling af seryl-tyrosin (H-Ser-Tyr-OH)

I en 4-halset kolbe på 4 liter opløses ved stuetemperatur 177,0 g benzyloxycarbonyl-seryl-tyrosin-p-nitrobenzylester (Z-Ser-Tyr-ONb) i 2,0 liter methanol og 1,0 liter dimethylformamid. Opløsningen blandes med 10,0 g af en katalysator (Pd/aktivt kul) fugtet med vand og hydrogeneres under omrøring ved stuetemperatur i 2 timer.

Derefter filtreres og eftervaskes to gange med methanol/DMF (2:1). Filtratet inddampes i vakuum til tørhed. Remanensen indrøres i diisopropylether, hvorved produktet udfælder som et fnugget bundfald, der hurtigt sedimenterer, og som kan frasuges. Produktet tørres i vakuum. Udbytte: 100,3 g (87% af teorien).

$[\alpha]_D^{22}$ = +33,2° (c = 1, methanol).

Eksempel 5.3

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-OH

100,3 g seryl-tyrosin (indhold: 77%) suspenderes i 500 ml DMF. Til suspensionen sættes 249 g af en 50%'s opløsning af Z-Trp-ONSu i DMF og 35 ml N-ethylmorpholin. Efter ca. 2 timer er suspensionen opløst under omrøring ved stuetemperatur. Opløsningsmidlet fjernes i vakuum, og remanensen optages i 500 ml ethylacetat. Ethylacetatfasen udrøres med 1 liter af en 85%'s natriumbicarbonatopløsning, den organiske fase kastes bort efter DC-kontrol, og der blandes på ny med 1 liter ethylacetat og gøres forsigtigt surt med 1,4 liter af en 10%'s $KHSO_4$-opløsning. Den organiske fase fraskilles, vaskes med 1 liter vand og koncentreres i vakuum til ca. 300 ml, hvorved produktet allerede begynder at udkrystallisere. Krystallisationen fuldstændiggøres ved tilsætning af 1,5 liter diisopropylether. Bundfaldet frafiltreres og tørres ved 40°C i vakuum. Udbytte: 126,7 g (75% af teorien), smp. 165-172°C.

$[\alpha]_D^{22}$ = +6,2° (c = 1, methanol).

Eksempel 6.1

Fremstilling af Z-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt *Tos-OH

I en omrøringsbeholder på 100 liter fyldes 60 kg (63 liter) DMF, derefter opløses successivt 10,34 kg (11,5 mol) H-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHEt * 2 Tos-OH og 6,77 kg (11,5 mol) Z-Trp-Ser-Tyr-OH deri, og opløsningen afkøles til 5°C. I tilløbsbeholderen fyldes 10,13 kg (11,12 liter) N-ethylmorpholin, og 1,5 liter deraf får til at begynde med lov til at flyde ind i reaktionsopløsningen.

I løbet af ca. 1 time indpumpes ved mellem ca. 5 og 10°C 15,3 kg (11,1 liter) n-propylphosphonsyreanhydrid (50%'s i methylenchlorid) sammen med den restende mængde N-ethylmorpholin. Efter afsluttet tilsætning, forøges reaktionstemperaturen til ca. 25°C, og blandingen omrøres i 5 timer. Reaktionsopløsningen koncentreres til et restvolumen på ca. 25 liter ved vakuumdestillation. Den koncentrerede remanens overføres med 150 liter n-butanol i en omrøringsbeholder på 250 liter med en lige så stor fraskillelsesbeholder, derefter ekstraheres butanolfasen successivt med følgende vandige opløsninger: 1) sodaopløsning, 2) kogsaltopløsning, 3) sodaopløsning, 4) vand, 5) $KHSO_4$-opløsning og 5) kogsaltopløsning.

Den organiske fase koncentreres til ca. 50 liter, koncentratet overføres til omrøringsbeholderens tilløbsbeholder, omrøringsbeholderen fyldes med 165 kg (230 liter) diisopropylether, og i denne omrørte væske inddoseres i løbet af 1 time 25 liter af butanolkoncentratet. Det opståede bundfald efteromrøres i endnu 1 time og fracentrifugeres slutteligt. Der gås frem på samme måde med den anden halvdel af butanolkoncentratet. Tørringen af produktet sker i vakuum ved 35-40°C. Udbytte: 13,5 kg (90% af teorien). $[\alpha]_D^{22}$ = -33,7°C (c = 1, dimethylacetamid).

Patentkrav

1. Fremgangsmåde til fremstilling af peptider med den almene formel (I)

$$U - A^1 - A^2 - A^3 - A^4 - A^5 - X \qquad (I)$$

hvor
U er en urethanbeskyttelsesgruppe,
A^1 er Trp eller D-Trp,
A^2 er Ser, Ala eller Thr,
A^3 er Tyr eller Phe,
A^4 er Gly, en rest af en D-aminosyre eller en rest af et D-aminosyrederivat,
A^5 er Leu, N-methyl-Leu, N-ethyl-Leu, Ser(Bu^t), Cys(Bu^t), Asp(OBu^t), Glu(OBu^t), Orn(Boc) eller Lys(Boc), og
X er OBu^t eller A^6-Pro-Y,
idet A^6 står for Arg, Orn, Lys eller homoarginin, og
Y står for Gly-NH_2, NH-NH-CO-NH_2, (C_1-C_3)-alkylamino, cyclopropylamino, med hydroxy eller fluor substitueret (C_1-C_3)-alkylamino eller med hydroxy eller fluor substitueret cycloalkylamino,
k e n d e t e g n e t ved, at man omsætter et tripeptid med den almene formel (II)

$$U - A^1 - A^2 - A^3 - OH \qquad (II)$$

hvor
U, A^1, A^2 og A^3 er som defineret ovenfor,
med et peptid med den almene formel (III)

$$H - A^4 - A^5 - X \qquad (III)$$

hvor
A^4, A^5 og X er som defineret ovenfor.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at U betyder benzyloxycarbonyl (Z).

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at
A^1 betyder Trp,
A^2 betyder Ser,
A^3 betyder Tyr,
A^4 betyder Gly, D-Ala, D-Leu, D-Ser(Bu^t), D-Trp, D-Phe, D-Gln(cyclohexyl), D-naphthylalanin, D-benzylhistidin, D-Thr(Bu^t), D-Cys(Bu^t), D-Asp(OBu^t), D-Glu(OBu^t), D-Orn(Boc) eller D-Lys(Boc), A^5 betyder Leu, og
X betyder OBu^t, Arg-Pro-NHC_2H_5, Arg-Pro-Gly-NH_2 eller Arg-Pro-NH-NH-CO-NH_2.

4. Fremgangsmåde ifølge et af kravene 1-3 til fremstilling af

U-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2

eller

U-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu^t)-Leu-Arg-Pro-NHC_2H_5.

5. Fremgangsmåde ifølge et af kravene 1 til 4, k e n d e t e g n e t ved, at den gennemføres i nærværelse af dicyclohexylcarbodiimid under tilsætning af 1-hydroxybenzotriazol eller 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin eller N-hydroxysuccinimid.

6. Fremgangsmåde ifølge et af kravene 1 til 4, k e n d e t e g n e t ved, at den gennemføres i nærværelse af anhydrider af alkanphosphonsyrer eller dialkylphosphinsyrer.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at den gennemføres i nærværelse af n-propylphosphonsyreanhydrid eller methylethylphosphinsyreanhydrid.

8. Tripeptid, k e n d e t e g n e t ved, at det har den almene formel (II)

$$U - A^1 - A^2 - A^3 - OH \qquad (II)$$

hvor
U, A^1, A^2 og A^3 er som defineret i krav 1.

9. Tripeptidet Z - Trp - Ser - Tyr - OH.