



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 137152

(51) Int. Cl.² C 07 C 103/52

(21) Patentsøknad nr. 1045/71
(22) Inngitt 18.03.71
(23) Løpedag 18.03.71

(41) Alment tilgjengelig fra 27.09.71
(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 03.10.77

(30) Prioritet begjært 24.03.70, Japan, nr. 25541/70

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte for fremstilling
av kortikotrope oktadekapeptider.

(71)(73) Søker/Patenthaver SHIONOGI & CO. LTD.,
12, 3-chome, Dosho-machi,
Higashi-ku, Osaka,
Japan.

(72) Oppfinner HIDEO OTSUKA, Mino-shi, Osaka Pref.,
KEN INOUE, Kobe-shi, Hyogo Pref.,
begge Japan.

(74) Fullmektig Siv.ing. Audun Kristensen,
J.K. Thorsens Patentbureau, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Den foreliggende oppfinnelse angår en analogifremgangsmåte for fremstilling av kortikotrope oktadekapeptider representert ved følgende formel: β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-X-Y-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-ornityl-L-lysyl-L-arginyl-Z, hvori X er en L-metionin-, L-norvalin-, L-norleucin-, L-leucin- eller α -aminosmørsyrerest; Y er en L-glutaminsyre- eller L-glutaminrest og Z er en L-arginin, L-argininamid- eller L-argininesterrest; ikke-giftige syreaddisjons-salter eller komplekser derav, og det særegne ved oppfinnelsen er at et beskyttet decapeptid med formel: R_1 - β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-X- Υ - R_2 -L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin, hvori R_1 er en amino-beskyttende gruppe; X har den ovennevnte betydning og R_2 er en karboksyl-beskyttende gruppe, omsettes med et beskyttet oktadekapeptid av formel: N^ϵ - R_3 -L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl- N^δ - R_4 -L-ornityl- N^ϵ - R_5 -L-lysyl-L-arginyl-Z, hvori R_3 , R_4 og R_5 hver er en amino-beskyttende gruppe og Z har den ovennevnte betydning, ved den aktiverte ester-metode, dicykloheksyl-karbodiimid-metoden, azidmetoden, metoden med blandede anhydrider eller en kombinasjon derav, og beskyttende grupper fjernes (avblokkeres) fra det dannede beskyttede oktadekapeptid med formel: R_1 - β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-X- Υ - R_2 -L-glutamyl-L-histidyl-L-fenyl-alanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycyl- N^ϵ - R_3 -L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl- N^δ - R_4 -L-ornityl- N^ϵ - R_5 -L-lysyl-L-arginyl-Z, hvori R_1 , X, R_2 , R_3 , R_4 , R_5 og Z har de ovennevnte betydninger ved hydrogenolyse, acidolyse, alkalisk forsepning, hydrazinolyse eller reduksjon med natrium i flytende ammoniakk, og om ønsket omdannes det dannede (avblokkerte) oktadekapeptid til syreaddisjonssalter eller komplekser derav på i og for seg kjent måte.

Disse β -alanin, γ -ornitin- γ -oktadekapeptider, som i det følgende er

angitt som β -Ala¹, Orn¹⁵]-oktadekapeptider) fremstilt ved den foreliggende oppfinnelse er nyttige som et medikament, fordi de viser markerte kortikotropin-aktiviteter, som f.eks. adrenal-stimulerende aktivitet, lipotropisk aktivitet eller melanocyt-stimulerende aktivitet, og disse aktiviteter er av lang varighet.

I 1965 ble syntesene for oktadekapeptider, ACTH(1-18)-OH og ACTH(1-18)-NH₂, tilsvarende de første atten aminosyrerestene i kortikotropin (ACTH), rapportert av de samme oppfinnere og medarbeidere (Biochem.(Tokyo) 58 512 (1965)). Senere ble syntesene for det analoge 1-glycin, dvs. Gly¹-ACTH(1-18)-NH₂ rapportert i Bull. Chem. Soc. Japan 43 196 (1970). Fra disse syntetiske og biologiske studier av kortikotropinpeptider har oppfinnerne funnet at de amino-terminale atten rester utgjør de minimale krav for frembringelse av en høy adrenal-stimulerende aktivitet. ACTH(1-18)-NH₂ og Gly¹-ACTH(1-18)-NH₂ ble imidlertid funnet å ha en mindre aktivitet enn det naturlige hormon, særlig når de ble tilført subkutan eller intravenöst. Nylig ble et utmerket kortikotropin-peptid, dvs. β -Ala¹-ACTH(1-18)-NH₂ rapportert av oppfinnerne og al (Bull. Chem. Soc. Japan 43 1163 (1970)). Dette peptid har biologiske egenskaper som er vesentlig forbedret i forøkning av styrke, på grunn av den avtatte følsomhet overfor virkningen av intracellulær aminopeptidase. Amino-terminal substitusjonen med β -alanin forbedret stabiliteten av peptidet i vevet, men ikke stabiliteten i blod. I virkeligheten var den analoge virkningen av 1- β -alanin i blod mindre varig enn for det naturlige kortikotropin, noe som indikerte at det første ble hurtigere inaktivert enn det siste ved virkningen av endopeptidase i blod, når det ble tilført ved intravenøs metode. Således har det vært ønskelig med en ytterligere forbedring ved å tillate kort-kjede-peptidet å komme nærmere det naturlige kortikotropin, ut fra en industriell fremstilling og praktisk anvendelse.

Som et resultat av undersøkelsene av kortikotropinpeptider har det blitt oppdaget av oppfinnerne at β -Ala¹, Orn¹⁵]-oktadekapeptider har en forbedret biologisk egenskap med hensyn til varigheten av virkningen og at de har samme nivå for adrenal-stimulerende

aktivitet som det naturlige kortikotropin. Det har også blitt oppdaget at slike forbedrede egenskaper skyldes senkning i følsomhet for β -Ala¹, Orn¹⁵-oktadekapeptider overfor virkningen av endopeptidase i blod og aminopeptidase i vev.

Kondensasjon for dannelselse av peptidbinding kan utføres ved vanlige metoder, men de mest vanlige benyttede metoder er den aktiverte estermetode, dicykloheksylkarbodiimidmetoden, azidmetoden og den blandede anhydridmetode.

I fremstillingen av β -Ala¹, Orn¹⁵-oktadekapeptider er en hver fri funksjonell gruppe som ikke tar del i reaksjonen fortrinnsvis beskyttet; særlig ved slike grupper som kan bli lett fjernet ved hydrogenolyse, acidolyse, alkalisk forsåpning, hydrazinolyse eller natrium i flytende ammoniakk-reduksjon. Karboksylgruppen er fortrinnsvis beskyttet ved forestring, f.eks. med en lavere alkanol.

Aminogruppen er fortrinnsvis beskyttet ved innføring av en gruppe som f.eks. t-butyloksykarbonylgruppe, t-amylloksykarbonylgruppe, o-nitrofenylsulfenylgruppe, 2-(p-difenyl)-isopropylloksykarbonylgruppe, benzyloksykarbonylgruppe, p-nitrobenzyloksykarbonylgruppe, tosylgruppe, formylgruppe eller tritylgruppe på en vanlig måte. For beskyttelse av guanidylgruppen av arginin, blir det fortrinnsvis benyttet en nitrogruppe, tosylgruppe eller adamantylloksykarbonylgruppe, men beskyttelsen av guanidylgruppen er ikke alltid nødvendig. α -karboksylgruppen av glutaminsyre blir fortrinnsvis beskyttet ved slike karboksyl-beskyttende grupper som nevnt ovenfor, og ω -aminogruppen av lysin eller ornitin blir fortrinnsvis beskyttet ved slike aminobeskyttende grupper som nevnt ovenfor. Imidazolgruppen av histidin kan bli beskyttet ved tosylgruppen, benzyloksykarbonylgruppe eller benzylgruppe. Videre kan hydroksylgruppen av serin eller tyrosin bli beskyttet ved en acetylgruppe, benzylgruppe eller t-butylgruppe, men en slik beskyttelse er ikke alltid nødvendig.

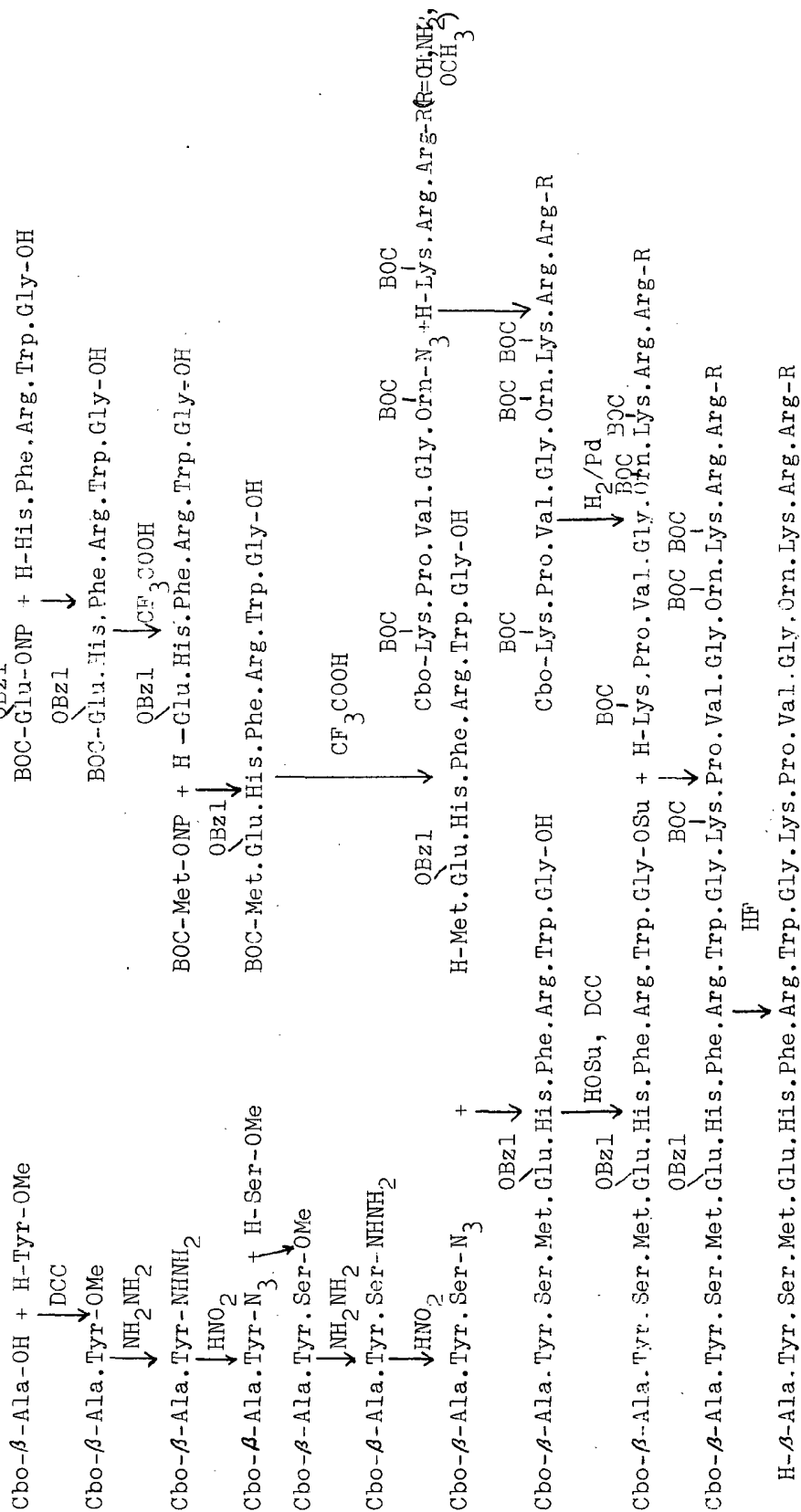
I tillegg til aminosyrerestene ved amino-terminalen og ved stilling 15 kan videre en del andre rester av aminosyresekvensen av kortiko-

tropinpeptidet bli erstattet av andre aminosyrer, uten vesentlig å forringe den kortikotropiske aktivitet. Således kan den fjerde aminosyren, metionin, bli erstattet med norvalin, norleucin, leuvin eller α -aminosmørsyre og/eller den femte aminosyren, glutaminsyre, kan bli erstattet med glutamin.

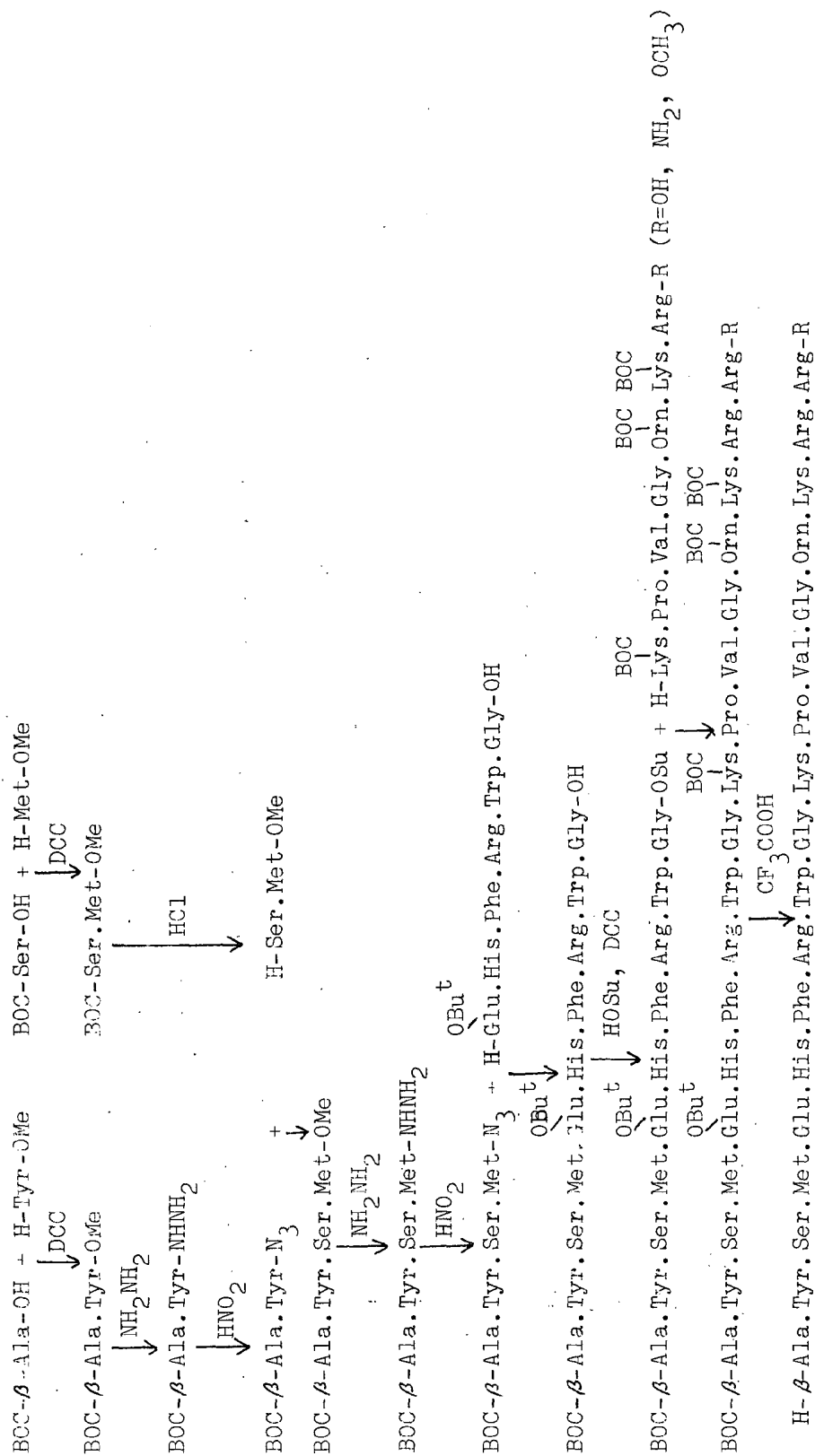
En sammenkoblingsreaksjon for fremstilling av peptidet (I) blir f.eks. utført ved å kondensere et beskyttet dekaeptid med formelen: R_1 - β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-X-Y R_2 -L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin, hvori R_1 er en amino-beskyttende gruppe; X er L-metioninrest, L-norvalinrest, L-norleucinrest, L-leucinrest eller α -aminosmørsyrerest og R_2 er en karboksyl-beskyttende gruppe, med et beskyttet oktapeptid av formelen: N^ε- R_3 -L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^δ- R_4 -L-ornityl-N^ε- R_5 -L-lysyl-L-arginyl-Z, hvori R_3 , R_4 , og R_5 hver er en amino-beskyttende gruppe og Z er L-argininrest, L-argininesterrest eller L-argininamidrest, ved den aktiverte estermetode, dicykloheksyl-karbodiimidmetoden, azidmetode, den blandede anhydridmetode eller en kombinert metode av disse i et inert løsningsmiddel ved en temperatur av -20°C til 60°C fra 2 timer til 7 dager, og å fjerne de beskyttende grupper fra det dannede beskyttede oktadekaeptid med formelen: R_1 - β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-X-Y R_2 -L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycyl-N^ε- R_3 -L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^δ- R_4 -L-ornityl-N^ε- R_5 -L-lysyl-L-arginyl-Z, hvori R_1 , X, R_2 , R_3 , R_4 , R_5 og Z har den ovenfor angitte betydning, ved hydrogenolyse, acidolyse, alkalisk forsåpning, hydrozinolyse eller reduksjon med natrium i flytende ammoniakk ved en temperatur av omkring -20°C til 60°C fra 30 minutter til 24 timer. De inerte løsningsmidler er dimetylformamid, dimetylsulfoksyd, dioksan, heksametylfosfortriamid, vandige løsninger av disse og blandinger av disse.

De foretrukne fremgangsmåter for fremstilling av $\angle\beta$ -Ala¹, Orn 15]-oktadekaeptider er vist i skjemaene I, II, III og IV.

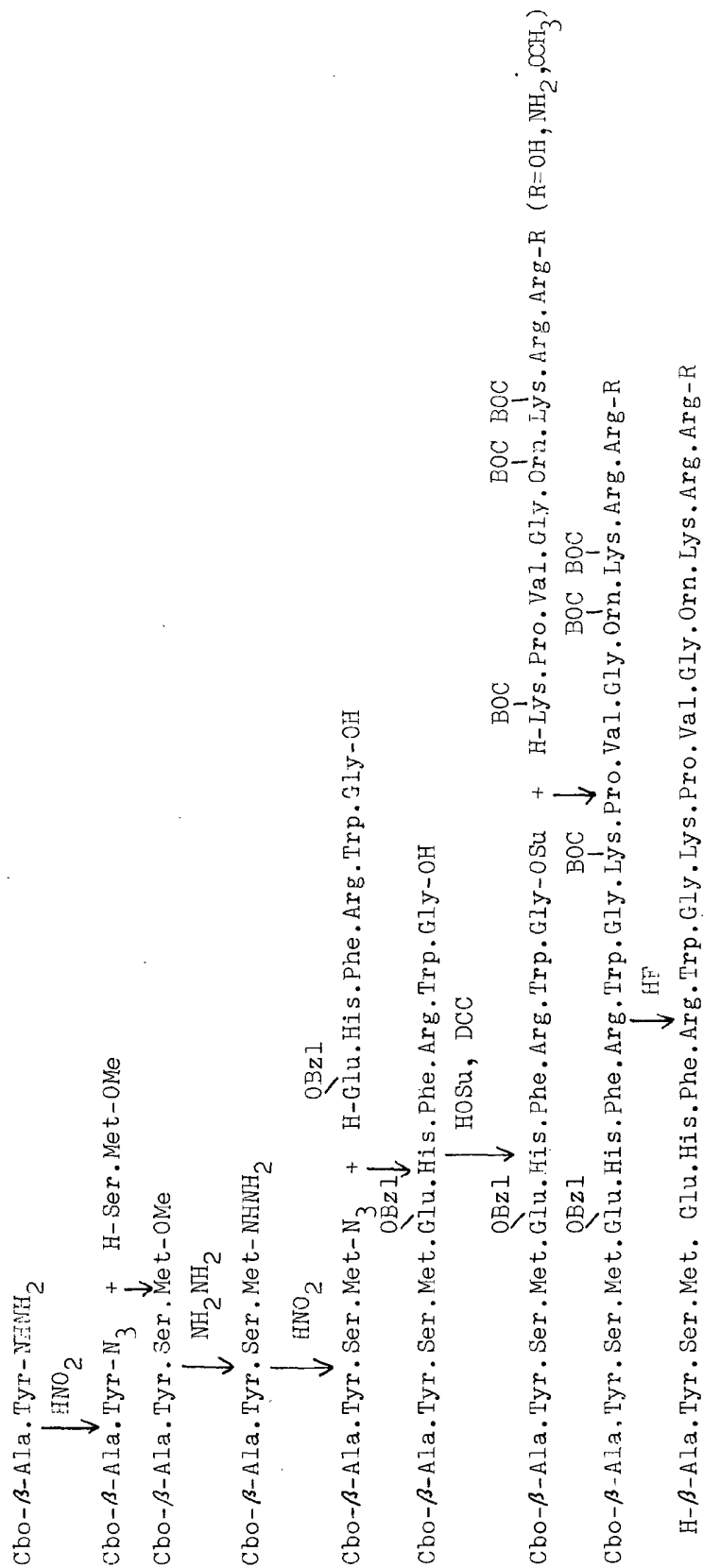
Skjema 1



Skjema II

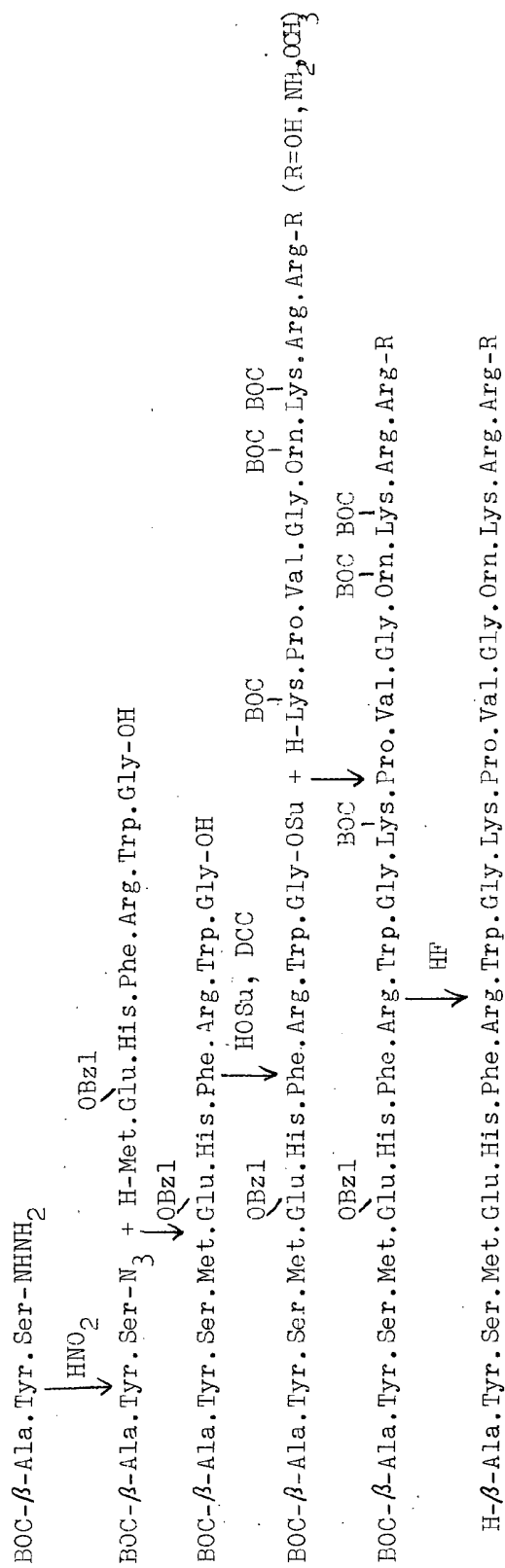


Skjema III



137152

Skjema IV



I synteseskjemaene er følgende forkortelser benyttet: β -Ala= β -alaninrest, Tyr=L-tyrosinrest, Ser=L-serinrest, Met=L-metioninrest, Glu=glutaminsyrerest, His=L-histidinrest, Phe=L-fenylalaninrest, Arg=L-argininrest, Trp=L-tryptofanrest, Gly=glycinrest, Lys=L-lysinrest, Pro=L-prolinrest, Val=L-valinrest, Orn=L-ornitinrest, Cbo=benzyloksykarbonyl, BOC=t-butyloksykarbonyl, Bzl=benzyl, OBu^t =t-butoksy, DCC=N,N'-dicykloheksylkarbodiimid, HOSu=N-hydrokysukkinimid, ONP=p-nitrofenoksy.

Som vist i synteseskjemaene omfatter den foretrukne prosess en sammenkobling av tripeptidet inneholdende de første 3 aminosyrer, dvs. β -alanyl-L-tyrosyl-L-serin eller tetrapeptidet, dvs. β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionin med heptapeptidet eller heksapeptidet tilsvarende til henholdsvis stillingen 4-10 eller 5-10, fortrinnsvis ved azidmetoden, hvorefter det dannede dekaeptid blir kondensert med peptidet som svarer til resten av molekylet (stillinger 11-18) fortrinnsvis ved den aktiverte estermetode.

Selvom den ovenfor nevnte fremgangsmåte er foretrukket for fremstillingen av de foreliggende kortikotropinpeptider er det mulig å substituere de beskyttende grupper, sammenkoblingsmetodene eller avblokkeringsmetodene som benyttet ovenfor, for ekvivalentene eller ekvivalente metoder og å bytte valget av peptidfragmenter og sammenkoblingsrekkefølge.

De beskyttede gruppene som benyttes ved den foreliggende oppfinnelse kan bli fjernet ved hydrogenolyse, alkalisk forsåpning, hydrazinolyse, natrium i flytende ammoniakkreduksjon eller ved behandling med en syre som f.eks. trifluorediksyre, maursyre, hydrogenhalogenid (f.eks. hydrogenfluorid, hydrogenbromid, hydrogenklorid), hydrogenhalogensyre (f.eks. fluorhydrogensyre, bromhydrogensyre, saltsyre) eller en blanding av disse, på en vanlig måte, avhengig av gruppens natur.

[β -Ala¹, Orn¹⁵]-oktadekaeptider fremstilt ved den foreliggende oppfinnelse kan bli ~~anset~~ ved kjente metoder, som f.eks. kolonnekromatografering med ioneutbyttings-harpiks, ioneutbyttings-

cellulose eller metoden med motstrømsfordeling.

β -Ala¹, Orn¹⁵]-oktadekapeptidene i følge oppfinnelsen fremstilles således i form av baser eller farmasøytisk tålbare ikke-giftige syreaddisjonssalter derav, avhengig av de benyttede reaksjonsbetingelser. Saltene kan også fremstilles ved å behandle oktadekapeptidene med uorganiske syrer som f.eks. hydrogenhalogen-syre (f.eks. fluorhydrogensyre, bromhydrogensyre, saltsyre), hydrogenhalogenid (f.eks. hydrogenfluorid, hydrogenbromid, hydrogenklorid), svovelsyre eller fosforsyre, eller med organiske syrer som f.eks. eddiksyre, maursyre, propionsyre, glukolsyre, melkesyre, pyrodruesyre, oksalsyre, malonsyre, ravsyre, maleinsyre, fumarsyre, vinsyre, sitronsyre, benzosyre, metansulfonsyre, benzensulfonsyre eller toluensulfonsyre, på en kjent måte. En ekvimolar- eller overskudds-mengde av syren kan bli benyttet ved slik saltdannelse.

De således fremstilte β -Ala¹, Orn¹⁵]-oktadekapeptider har en høy kortikotropisk aktivitet og en utmerket forlengelse av varighet. Halveringstiden i plasma er lenger enn for det naturlige kortikotropin. Detaljerte undersøkelser av de biologiske egenskaper av β -Ala¹, Orn¹⁵]-oktadekapeptider vil bli beskrevet nedenfor ved bruk av β -Ala¹, Orn¹⁵]-ACTH(1-18)-NH₂ som prøvepeptid.

Biologisk halveringstid for β -Ala¹, Orn¹⁵]-ACTH(1-18)-NH₂ ble bestemt med in vitro lipotropisk aktivitet [A. Tanaka, B.T. Pickering og C.H. Li., Arch. Biochem. Biophys. 99 294 (1962)] som et parameter. Resultatene er angitt i tabell 1, sammenlignet med det naturlige kortikotropin (sauekortikotropin; α_s -ACTH), β -Ala¹-ACTH(1-18)-NH₂ og Gly¹-ACTH(1-18)-NH₂.

Tabell 1. Halveringstid for kortikotropin og beslektede syntetiske peptider som in vitro lipotropiske midler

Peptid	In vivo ^{a)} (intravenös injeksjon)	In vitro ^{b)} inkubert med plasma
β -Ala ¹ , Orn ¹⁵ - ACTH(1-18)-NH ₂	4,5 min.	76,1 min.
α_s -ACTH	4,4 min.	59,2 min.
β -Ala ¹ -ACTH(1-18)-NH ₂	3,1 min.	35,4 min.
Gly ¹ -ACTH(1-18)-NH ₂	2,0 min.	30,0 min.

Merk: a) En peptidprøve ble injisert intravenöst inn i lavere vena cava på rotter og blodprøver, som ble samlet fra abdominal aorta ved passende tidsintervaller og surgjort, ble prøvd for den in vitro lipotropiske aktivitet. b) En prøve ble løst i friskt plasma fra bedøvet rotte og blandingen ble deretter inkubert ved 37°C. Prøver tatt fra blandingen etter passende tidsintervaller ble prøvd for den in vitro lipotropiske aktivitet.

De ovenfor angitte data viser klart at halveringstiden for β -Ala¹, Orn¹⁵-ACTH(1-18)-NH₂ er omtrent den samme som for det naturlige kortikotropin og lenger enn for beslektede peptider, når det blir tilført ved intravenös injeksjon. Videre er halveringstiden for β -Ala¹, Orn¹⁵-ACTH(1-18)-NH₂ meget lenger enn for det naturlige kortikotropin og beslektede oktadekapeptider når det inkuberes med plasma in vitro. Den forlengede varighet av aktivitet for de foreliggende oktadekapeptider skyldes den økede motstand i peptidet overfor virkningen av endopeptidase i blodet.

De adrenal-stimulerende aktiviteter av β -Ala¹, Orn¹⁵-oktadeka-peptider ble prøvd i følge fire forskjellige metoder og de ble sammenlignet med de for det naturlige saue-kortikotropin (α_s -ACTH). Den in vivo steroidogene aktivitet ved intravenøs tilførsel til hypofysestomisert rotte ble prøvd ved metoden til Lipscomb og Nelson [Endocrinol. 71 13 (1962)] med en mindre modifikasjon [A. Tanaka og C.H. Li., Endocrinol. Japonica 13 180 (1966)]. Den in vivo steroidogene aktivitet ble også prøvd i deksametason-pentobarbital-forhåndsbehandlet mus, [A. Tanaka og N. Nakamura, "Integrative mechanism of neuroendocrine system", Hokkaido University Medical Library Series 1 49 (1968)]. I tillegg ble den steroidogene aktivitet ved intramuskulær tilførsel til hypofysestomisert rotte bestemt, hvor en peptidløsning ble injisert til lårmuskelen og en blodprøve ble samlet fra abdominal aorta 30 min. etter injeksjonen. Videre ble den steroidogene aktivitet ved intravenøs tilførsel til hypofysestomisert rotte bestemt på en slik måte at et peptidpreparat ble injisert inn i lår-venen og en blodprøve ble samlet fra abdominal aorta 30 min. etter injeksjonen. Under eksperimentene ble "The Third USP Corticotropin Reference Standard" benyttet som standard og produksjonen av 11-hydroxycortikosteroider (11-OHCS) ble bestemt ved fluorfotometrisk metode til Peterson [J. Biol. Chem. 225 25 (1957)]. For hver prøvemethode ble flere bestemmelser utført og de uavhengige oppnådde data ble underkastet statistisk behandling ved hjelp av Sheps og Moore fremgangsmåte [J. Pharmacol. Exptl. Therap. 128 99 (1960)]. Resultatene av disse prøvene på β -Ala¹, Orn¹⁵-ACTH(1-18)-NH₂ er gitt i tabell 2 i sammenligning med det naturlige kortikotropin (α_s -ACTH).

Tabell 2. Adrenal-stimulerende aktivitet av oktadekapeptid og naturlig kortikotropin

Metode	Administrasjons- måte	Peptid	
		β -Ala ¹ , Orn ¹⁵ - ACTH(1-18)-NH ₂	α_s -ACTH
In vivo steroido- genase i:			
adrenal-cannulering	intravenöst	145	100
deksametasone- nembutal-blokkert mus	intravenöst	162	180
perifert blod	intravenöst	160	
perifert blod	intravenöst	86	

Merk: Aktivitetene er uttrykt i USP-enheter/mg, relativt til The Third USP Corticotropin Reference Standard.

De adrenal-stimulerende aktiviteter av β -Ala¹, Orn¹⁵-ACTH(1-18)-NH₂ er omtrent de samme som for det naturlige kortikotropin.

Oktadekapeptidet i følge oppfinnelsen viser en høy lipotropisk aktivitet, som er summert i tabell 3 og sammenlignet med det naturlige kortikotropin (α_s -ACTH).

Tabell 3. Lipotropisk aktivitet for oktadekapeptidet og naturlig kortikotropin

Forsöksdyr	Minimum effektiv dose (10 ⁻⁶ mg/50 mg vev)	
	β -Ala ¹ , Orn ¹⁵ - ACTH(1-18)-NH ₂	α_s -ACTH
Adipost vev på rotte	0,35	6,0
Adipost vev på kanin	0,10	7,1

Merk: Den lipotropiske aktivitet ble bestemt ved hjelp av den metode som er beskrevet av Tanaka et al [*Arch. Biochem. Biophys.* 99 294 (1962)] med rotte-epididymal-adiposevev og kanin-perirenal-adiposevev. Økningen i konsentrasjonen av ikke-forestret fett-syre i både medium og vev er parameteret. Aktiviteten uttrykkes som minste effektive dose pr. 50 mg vev.

Prøve for den in vitro melanocyt-stimulerende aktivitet av β -Ala¹, Orn¹⁵-ACTH(1-18)-NH₂ ble utført i følge metoden til K. Shizume, A.B. Lerner og T.B. Fitzpatrick [*Endocrinol.* 54 553 (1954)], ved bruk av isolerte hudfragmenter av Rana pipin-frøer. Den melanocyt-stimulerende aktivitet av det foreliggende oktadekapeptid ble funnet å være $0,7 \times 10^{10}$ U/g. Et rent preparat av naturlig α -melanocyt-stimulerende hormon ble benyttet som en standard.

β -Ala¹, Orn¹⁵-oktadekapeptidene i følge oppfinnelsen kan bli omdannet til det tilsvarende kompleks med et kompleksdannende tungt metall (f.eks. sink, kopper, jern, nikkel, kobolt), en kompleks-dannende polyaminosyre (f.eks. polyglutaminsyre, polyaspartinsyre, kopolyglutamyltyrosin, kopolyaspartylglutaminsyre) eller med en blanding av disse. Komplekset viser en utmerket lang-virkende egenskap sammenlignet med det vanlige peptid. Det tunge metallkompleks kan bli fremstilt ved å behandle oktadekapeptidet med en tung metallforbindelse som f.eks. tungt metallhalogenid (f.eks. sinkklorid, kopperklorid, jernklorid, koboltklorid, nikkelklorid), acetat (f.eks. sinkacetat), sulfat (f.eks. sinksulfat) eller hydroksyd (f.eks. sinkhydroksyd) i et omtrent forhold av 1:0,1 - 100 beregnet som vekt under svak sur betingelse, fortrinnsvis ved pH 6,5 til 7,0 på en vanlig måte. Blant de tunge metallene er sink mest foretrukket. Polyaminosyrekomplekset kan bli fremstilt ved å behandle oktadekapeptidet med en polyaminosyre i et omtrent forhold av 1:0,1 - 100 beregnet som vekt under svak sur betingelse, fortrinnsvis ved pH 6,5 til 7,0, på en vanlig måte. De benyttede polyaminosyrer er homopolymerer eller kopolymerer av aminosyrer og de kan være av L-, D- eller DL-konfigurasjon. Eksempler på foretrukkede polyamino-

syre er poly-L-glutaminsyre, poly-D-glutaminsyre, poly-DL-glutaminsyre, poly-L-aspartinsyre, poly-D-aspartinsyre, poly-DL-aspartinsyre, kopoly-L-glutamyl-L-tyrosin og kopoly-L-aspartyl-L-glutaminsyre. Foretrukket molekylvekt av polyaminosyren er omtrent 1.000 til 100.000, spesielt 2.000 til 6.000. Det er foretrukket å benytte en polyaminosyre som forut har blitt nøytralisert med et alkalisk middel (f.eks. natriumhydroksyd). Andre passende tilsetningsstoffer, som f.eks. et konserverende (f.eks. benzylalkohol, fenol, timerosal), buffer (f.eks. fosfat, karbonat, citrat) eller isotonerende-middel (f.eks. natriumklorid) kan tilsettes til fremstillingen av komplekset.

Det skal bemerkes at de ovenfor beskrevne data bare er gitt som eksempler. Siden de andre β -Ala¹, Orn¹⁵-oktadekapeptider har omtrent de samme egenskaper og fordeler som medikament, som det ovenfor beskrevne β -Ala¹, Orn¹⁵-ACTH(1-18)-NH₂, er β -Ala¹, Orn¹⁵-oktadekapeptider i følge oppfinnelsen meget nyttige og fordelaktige for terapeutiske formål, f.eks. for behandling av akutt eller kronisk artikulær rheumatisme, allergiske lidelser eller adrenarche i mennesker og dyr eller for undersøkelse av adrenokortikin-funksjonen.

Således kan β -Ala¹, Orn¹⁵-oktadekapeptidene, syreaddisjonssaltene og kompleksene av disse tilføres oralt eller parenteralt i følge kjente metoder, f.eks. som injeksjon, væske, suspensjon, emulsjon eller aerosol, eller i blanding med passende bærere, stabiliseringsmidler, emulgatorer, konserveringsmidler, buffere, isotoniserende og/eller fuktemidler, med innhold av en terapeutisk effektiv mengde av den aktive bestanddel.

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

De følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen.

Eksempel 1

(a) Benzyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosin-metylester

Til en løsning av benzyloksykarbonyl- β -alanin (8,9 g) og L-tyrosin-metylester (7,8 g) i acetonitril blir det tilsatt en løsning av N,N'-dicykloheksylkarbodiimid (8,3 g) i diklormetan ved 0°C. Blandingen blir satt tilside natten over ved 0°C og det utfelte dicykloheksylurea blir fjernet ved filtrering. Filtratet blir konsentrert under redusert trykk og gir en rest som løses i etylacetat. Løsningen blir vasket med 1N saltsyre og 5% natriumhydrogenkarbonat, tørket over natriumsulfat og konsentrert under redusert trykk for å gi en sirup-aktig rest, som blir krystallisert fra etylacetat. Rekrystallisering fra samme løsningsmiddel gir det ønskede produkt (13,2 g), med smeltepunkt 114 - 116°C. $[\alpha]_D^{27} + 6,2 \pm 0,4^\circ$ (c=1.040, metanol).

Analyse beregnet for $C_{21}H_{24}N_2O_6$: C = 62,99, H = 6,04, N = 6,93.
Funnet: C = 62,94, H = 6,06, N = 6,85.

(b) Benzyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosinhydrazid

Benzyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosinmetylester (4,81 g) blir løst i etanol (50 ml) og hydrazin (2,9 ml) blir tilsatt. Blandingen blir satt tilside ved romtemperatur i 2 til 3 timer ved 4°C natten over. Det utfelte krystalline hydrazid samles ved filtrering, vaskes med kald etanol og tørkes under redusert trykk for å gi det ønskede produkt (4,72 g), som blir behandlet med varm etanol. Smeltepunkt 225 - 228°C, $[\alpha]_D^{26} + 3,9 \pm 0,4^\circ$ (c = 1,032, 50% eddiksyre).

Analyse beregnet for $C_{20}H_{24}N_4O_5$: C = 59,99, H = 6,04, N = 13,99.
Funnet: C = 60,09, H = 6,16, N = 13,97.

(c) Benzyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-serin-metylester

Benzyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosin-hydrazid (2,40 g) blir løst i dimetylformamid (7 ml) og til løsningen blir det tilsatt 1N saltsyre (15 ml). Løsningen blir avkjølt med is og blandet med is-kald 2M natriumnitrit (3,6 ml). Blandingen blir holdt ved 0°C i 4 min. og det utfelte azid blir ekstrahert med is-kald etylacetat (25 ml x 2). Ekstraktene blir blandet, vasket med is-kald 5% natriumhydrogenkarbonat og tørket over natriumsulfat. Den dannede løsning blir tilsatt til en løsning av L-serin-metylesterhydroklorid (0,93 g) og trietylamin (0,84 ml) i 90% tetrahydrofuran (20 ml) og blandingen blir omrørt ved 4°C i 48 timer. Gelatin-aktige utfellinger blir samlet ved filtrering, vasket med vann og tørket under redusert trykk for å gi det ønskede produkt (1,58 g), som blir behandlet med varm etanol. Smeltepunkt 195 - 196°C. $[\alpha]_D^{26} = 2,1 \pm 0,4^\circ$ (c = 1,091 metanol).

Analyse beregnet for $C_{24}H_{29}N_3O_8$: C = 59,13, H = 6,00, N = 8,62.
 Funnet: C = 59,29, H = 6,08, N = 8,63.

(d) Benzyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-serin-hydrazid

Til en løsning av benzyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-serin-metylester (1,46 g) i dimetylformamid (5 ml) blir det tilsatt hydrazid (0,73 ml) og blandingen blir satt tilside ved 4°C i 24 timer og gir det krystalline hydrazid. Etter tilsetning av etanol blir krystallene samlet ved filtrering, vasket med etanol og tørket under redusert trykk for å gi det ønskede produkt (1,40 g), som blir behandlet med varm etanol for å gi det rene hydrazid (1,32 g), med smeltepunkt 220 - 224°C (spalting). $[\alpha]_D^{25} + 15,7 \pm 0,5^\circ$ (c = 1,042, iseddiksyre).

Analyse beregnet for $C_{23}H_{29}N_5O_7$: C = 56,66, H = 6,00, N = 14,37.
 Funnet: C = 56,35, H = 6,04, N = 14,57.

(e) t-butyloksykarbonyl- γ -benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin

Til en løsning av L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycinacetat (1,20 g) (fremstilt i følge metoden beskrevet i Bull. Chem. Soc. Japan 43 196 (1970) i 50% dimetylformamid (10 ml) blir det tilsatt t-butyloksykarbonyl- γ -benzyl-L-glutaminsyre-p-nitrofenylester (1,03 g) og dimetylformamid (25 ml) og blandingen blir satt tilside ved 4°C i 3 dager. Reaksjonsblandingene blir påpevis tilsatt til et blandet løsningsmiddel av etylacetat og eter (1:1 beregnet som volum, 200 ml) og utfellingene blir samlet ved filtrering. Utfellingene blir vasket med etylacetat og eter, og tørket under redusert trykk (utbytte 1,86 g). Produktet blir igjen løst i 50% eddiksyre (ca. 10 ml) og etanol (ca. 100 ml) blir tilsatt. Den utfelte masse blir samlet og lyofilisert fra eddiksyre for å gi det ønskede produkt (1,37 g). $[\alpha]_D^{22} = 23,9 \pm 0,6^\circ$ (c = 1,020, 50% eddiksyre).

Analyse beregnet for $C_{51}H_{64}N_{12}O_{11} \cdot CH_3COOH \cdot 3H_2O$:

C = 56,07, H = 6,57, N = 14,81, $CH_3CO = 3,79$.

Funnet: C = 56,40, H = 6,22, N = 15,40, $CH_3CO = 3,25$.

(f) t-butyloksykarbonyl-L-metionyl- γ -benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin

t-butyloksykarbonyl- γ -benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin (1,26 g) blir løst i trifluoreddiksyre (6 ml) og løsningen blir holdt ved romtemperatur i 30 min. Løsningen blir avkjølt i et isbad og eter tilsettes. Det dannede, delvis avblokkerte heksapeptid som utfelles (1,34 g) blir løst i dimetylformamid (10 ml) og til løsningen blir det tilsatt trietylamin (0,46 ml) og t-butyloksykarbonyl-L-metionin-p-nitrofenylester (0,74 g). Blandingene blir holdt ved 4°C i 24 timer og helles over i etylacetat-eter (1:4 beregnet som volum, 250 ml).

Den utskilte utfelling blir samlet ved filtrering, vasket med eter og tørket under redusert trykk (utbytte 1,56 g). Utfellingen blir suspendert i etanol (15 ml), varmet og avkjølt. De dannede utfellinger blir samlet ved filtrering, vasket med kald etanol og eter, lyofilisert fra etylacetat for å gi det ønskede produkt (1,16 g). $\alpha_D^{22} = 18,5 \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,072$, dimetylformamid).

Analyse beregnet for $C_{56}H_{73}N_{13}O_{12}S \cdot CH_3COOH \cdot 2H_2O$:

C = 54,23, H = 6,67, N = 14,18.

Funnet: C = 54,51, H = 6,16, N = 13,94.

(g) Benzyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionyl- γ -benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin

t-butylloksykarbonyl-L-metionyl- γ -benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin (1,09 g) blir under isavkjøling løst i trifluorediksyre (3 ml) som inneholder en dråpe vann. Reaksjonsblandingen blir satt til side ved romtemperatur i 30 min. og det dannede heptapeptid-trifluoracetat blir utfelt ved tilsats av eter. Utfellingen blir samlet ved filtrering, vasket godt med eter og tørket under redusert trykk (utbytte 1,21 g).

En blanding av benzyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-serinhydrazid (0,86 g), 1N saltsyre (4 ml) og dimetylformamid (5 ml) blir avkjølt i et isbad, og is-kald 2M natriumnitrit (0,96 ml) blir tilsatt dråpevis. Blandingen blir omrørt ved 0°C i 4 min. og is-kald dimetylformamid (10 ml) blir tilsett for å løse det utfelte azid. Etter tilsetning av trietylamin (0,56 ml) blir den resulterende løsning tilsatt til en løsning av heptapeptid-trifluoracetat fremstilt ovenfor og trietylamin (0,49 ml) i is-kald dimetylformamid (20 ml). Reaksjonsblandingen blir satt til side ved 0°C i 24 timer og eddiksyre (1 ml) blir tilsatt. Løsningsmidlet blir fjernet ved inndamping under redusert trykk ved en bad-temperatur av 45°C for å gi en sirup-aktig rest, som

blir tilsatt med etanol (20 ml). Den gelatin-aktige masse som felles ut blir samlet ved filtrering, vasket omhyggelig med etanol, etylacetat og eter og tørket under redusert trykk (utbytte 0,88 g). Filtratet og utvaskingene blir blandet og konsentrert under redusert trykk for å gi en rest. Resten blir løst i etylacetat og uløselige utfellinger blir samlet ved filtrering. Utfellingen blir varmet i etanol til kokepunktet, avkjølt og filtrert vekk (0,27 g). Totalt utbytte utgjør 1,15 g. De blandede utfellingene blir renset ved behandling med varm etanol. $[\alpha]_D^{22} = 18,5 \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,067$, dimetylformamid), $R_f = 0,75$ (silikagel tyynn-skikts kromatografering i et løsningsmiddel-system av n-butanol-eddiksyre-pyridin-vann = 30:6:20:24), $R_f = 0,80$ (papirkromatografering i et løsningsmiddel-system av n-butanol-eddiksyre-vann = 4:1:2).

Analyse beregnet for $C_{74}H_{90}N_{16}O_{17}S \cdot 2CH_3COOH \cdot 3H_2O$:

C = 55,70, H = 6,23, N = 13,33.

Funnet: C = 55,71, H = 6,06, N = 13,34.

(h) N^α -benzyloksykarbonyl- N^ϵ -t-butylloksykarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl- N^δ -t-butylloksykarbonyl-L-ornitin-metylester

N^α -benzyloksykarbonyl- N^δ -t-butylloksykarbonyl-L-ornitin-metylester [1,20 g, smeltepunkt $69 - 70^\circ C$, $[\alpha]_D^{28} = 10,6 \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,092$, metanol)] blir hydrogenert over palladium-sort katalysator i metanol som inneholder 10% eddiksyre i 2 timer. Inndamping av løsningsmidlet under redusert trykk gir N^δ -t-butylloksykarbonyl-L-ornitin-metylesteracetat som en sirup-aktig rest, som blir behandlet med 50% vandig kaliumkarbonat i diklormetan ved $0^\circ C$. Det organiske lag blir tørket over natriumsulfat og inndampes under redusert trykk ved en bade-temperatur av $20^\circ C$. Den dannede rest blir løst i diklormetan (10 ml) og til løsningen blir det tilsatt N^α -benzyloksykarbonyl- N^ϵ -t-butylloksykarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycin (1,83 g) fremstilt i henhold til metoden beskrevet i Bull. Chem. Soc. Japan 37 1471 (1964). Til løsningen

blir det tilsatt en løsning av N,N'-dicykloheksylkarbodiimid (0,60 g) i diklormetan ved 0°C. Blandingen blir satt tilside ved 4°C i 2 dager. Etter fjernelse av dicykloheksylurea ved filtrering blir filtratet konsentrert under redusert trykk for å gi en sirup-aktig rest. Resten blir løst i etylacetat, vasket med iskald 1N saltsyre og 1M natriumbikarbonat, tørket over natriumsulfat og konsentrert under redusert trykk. Den resulterende rest blir igjen løst i etylacetat (30 ml) og blandet med eter (30 ml) for å gi det ønskede ²⁶pentapeptidmetylester i en ren form. Utbytte 2,24 g. $[\alpha]_D^{25} = 55,9 \pm 0,9^\circ$ (c = 1,062, metanol).

Analyse beregnet for $C_{42}H_{67}N_7O_{12}$: C = 58,52, H = 7,83, N = 11,37.

Funnet: C = 58,52, H = 8,08, N = 11,33.

- (i) N^α-benzyloksykarbonyl-N^ε-t-butylloksykarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^δ-t-butylloksykarbonyl-L-ornitin-hydrazid

Den ovenfor fremstilte pentapeptidmetylester (2,2 g) blir løst i metanol (30 ml) og hydrazin (0,26 ml) blir tilsatt. Reaksjonsblandingen blir satt tilside ved romtemperatur i 3 dager og hydrazidet helles ut ved tilsetning av vann. Utfellingen blir samlet ved filtrering og krystallisert fra metanol-vann for å gi det ønskede hydrazid (2,1 g), smeltepunkt ved 175 - 180°C. $[\alpha]_D^{25} = 35,8 \pm 0,7^\circ$ (c = 1,040, dimetylformamid).

Analyse beregnet for $C_{41}H_{67}N_9O_{11}$: C = 57,13, H = 7,83, N = 14,62.

Funnet: C = 57,01, H = 7,87, N = 14,41.

- (j) N^α-benzyloksykarbonyl-N^ε-t-butylloksykarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^δ-t-butylloksykarbonyl-L-ornityl-N^ε-t-butylloksykarbonyl-L-lysyl-L-arginyl-L-argininamid-diacetat

Til en iskald løsning av det ovenfor fremstilte pentapeptidhydrazid (0,95 g) i 90% tetrahydrofuran (10 ml) blir det tilsatt

is-kald 1N saltsyre (2,75 ml) og 2M natriumnitrit (0,61 ml). Blandingen blir satt tilside ved 0°C i 5 min. og justert til pH 7,4 - 7,6 ved tilsetning av trietylamin (0,38 ml). Til løsningen blir det tilsatt en is-kald løsning av N^E-t-butyloksykarbonyl-L-lysyl-L-arginyl-L-arginin-amid-triacetat (fremstilt fra 0,92 mmol av N^α-benzyloksykarbonyl-N^E-t-butyloksykarbonyl-L-lysyl-N^G-nitro-L-arginyl-N^G-nitro-L-arginin-amid ved katalyttisk hydrogenering i følge metoden beskrevet i Bull. Chem. Soc. Japan 39 882 (1966) og trietylamin (0,42 ml) i 80% tetrahydrofuran (7,5 ml). Blandingen blir satt tilside ved 4°C i 3 dager og konsentrert under redusert trykk. Til den dannede rest blir det tilsatt etylacetat (10 ml) og 1N eddiksyre (10 ml) og blandingen blir godt ristet. Den vandige fase blir ekstrahert tre ganger med etylacetat og de kombinerte ekstrakter blir konsentrert under redusert trykk til omtrent 10 ml. Konsentratet blir godt ekstrahert med vannmettet n-butanol. Ekstrakten blir tørket over natriumsulfat og konsentrert under redusert trykk. Den dannede rest blir lyofilisert fra eddiksyre for å gi det ønskede produkt (0,85 g). $[\alpha]_D^{22} = +3,1 \pm 1,5^\circ$ (c = 0,54, 50% eddiksyre).

Analyse beregnet for C₆₄H₁₁₀O₁₆N₁₈·2CH₃COOH·4H₂O:

C = 51,70, H = 8,04, N = 15,96, CH₃CO = 5,11.

Funnet: C = 51,60, H = 7,72, N = 15,62, CH₃CO = 4,30.

(k) β-Alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionyl-L-glytanyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-L-glycyl-L-ornityl-L-lysyl-L-arginyl-L-argininamid

Til en løsning av benzyloksykarbonyl-β-alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionyl-γ-benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin (0,405 g) i eddiksyre (5 ml) blir det tilsatt 1N saltsyre i eddiksyre (0,5 ml) og blandingen blir øyeblikkelig lyofilisert, etterfulgt av tørking over natriumhydroksydperler. Det således fremstilte decapeptid-hydroklorid blir løst i dimetylformamid (4 ml) sammen med N-hydroksysukkinimid (0,104 g) og til

denne løsning blir det tilsatt en løsning av N,N'-dicykloheksyl-karbodiimid (0,186 g) i dimetylformamid (2 ml). Blandingen blir holdt ved 4°C natten over. Det utfelte dicykloheksylurea blir fjernet ved filtrering og filtratet blir helt over i et is-kaldt blandet løsningsmiddel av etylacetat (50 ml) og eter (50 ml). Den dannede utfelling blir filtrert vekk, vasket med etylacetat og eter, tørket under redusert trykk for å gi den dekaeptid-aktive ester (0,435 g).

N^α-benzyloksykarbonyl-N^ε-t-butylloksykarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^δ-t-butylloksykarbonyl-L-ornityl-N^ε-t-butylloksykarbonyl-L-lysyl-L-arginyl-L-argininamid (0,230 g) blir hydrogenert over palladium som katalysator i 90% metanol inneholdende eddiksyre (0,1 ml) i 3 timer. Etter fjernelse av katalysatoren blir filtratet konsentrert under redusert trykk for å gi en sirupaktig rest, som blir lyofilisert fra eddiksyre og gir 0,262 g av et pulver. Dette produkt blir løst i dimetylformamid (2 ml) og trietylamin (0,2 ml) blir tilsatt. Til løsningen blir det tilsatt en løsning av den ovenfor fremstillede dekaeptid-aktive ester (0,435 g) i dimetylformamid (1,5 ml) og blandingen blir satt tilside ved 4°C i 45 timer. Deretter ble reaksjonsblandingen helt over i is-kald etylacetat (100 ml) og den dannede utfelling ble samlet ved filtrering. Utfellingen ble vasket med etylacetat og eter, lyofilisert fra eddiksyre og tørket over natriumhydroksydeppler under redusert trykk for å gi det urene beskyttede okta-dekaeptid (0,662 g).

Det beskyttede oktadekaeptid (0,646 g) blir behandlet med hydrogenfluorid (ca. 10 ml) ved 0°C i 60 min. i nærvær av anisol (0,6 ml) og L-metionin (0,12 g). Etter fjernelse av hydrogenfluorid ved inndamping blir resten løst i is-kaldt vann og løsningen blir vasket med etylacetat. Løsningen blir sendt gjennom en kolonne (1,7 x 15 cm) av Amberlite CG-400 (acetatform). Kolonnen blir vasket godt med vann og den vandige løsning blir samlet opp. Løsningen blir konsentrert til et lite volum og lyofilisert. Det urene avblokkerte peptid (0,704 g) blir underkastet kromatografering i en kolonne (2,7 x 32 cm) av karboksy-

metylcellulose (Serva, 0,56 meq/g) ved bruk av en ammonium-acetatbuffer (pH 6,5, 2000 ml) med en lineær konsentrasjons-gradient fra 0,025 - 0,6 M. Fraksjoner av 10 ml blir samlet og absorpsjonen ved 280 m μ blir undersøkt. Fraksjonene som tilsvarende hovedtoppen (prøverør nr. 153 - 180) og skulder av denne (prøverør nr. 181 - 200) blir samlet hver for seg og hovedmassen av løsningsmidlet blir fjernet ved inndamping under redusert trykk ved en bad-temperatur på 50 - 55°C. Restene blir lyofilisert til konstante vekter og gir 228 mg (F-I) og 62 mg (F-II) av fargelöst bløtt pulver fra de to fraksjoner respektivt. F-I (228 mg) blir på nytt kromatografert i en karboksylmetylcellulose-kolonne (2,2 x 27 cm) på samme måte som beskrevet ovenfor, og det rensede peptid (195 mg, F-I-1) blir oppnådd fra en enkel topp. En liten skulder av toppen gir F-I-2 (20 mg). F-II (62 mg) og F-I-2 (20 mg) blir blandet og den kromatografiske renselse blir gjentatt to ganger for å gi en ytterligere mengde av rent peptid (46 mg). Totalt utbytte av oktadekapeptidet utgjør således 241 mg.

$$[\alpha]_D^{22} = 55,4^{\circ} \quad (c = 0,5, 0,1 \text{ N eddiksyre}), \quad \text{UV } \lambda_{\text{max}}^{0,1 \text{ N-HCl}} =$$

$$279 \text{ m}\mu \quad (E_{1\text{cm}}^{1\%} 24,4), \quad \lambda_{\text{skulder}}^{0,1 \text{ N-HCl}} = 288 \text{ m}\mu \quad (E_{1\text{cm}}^{1\%} 17,8),$$

$$\lambda_{\text{max}}^{0,1 \text{ N-NaOH}} = 281 \text{ m}\mu \quad (E_{1\text{cm}}^{1\%} 25,9), 288 \text{ m}\mu \quad (E_{1\text{cm}}^{1\%} 25,0).$$

Aminosyreforholdet i syrehydrolysatet: serin 0,83, glutaminsyre 0,96, prolin 1,04, glycin 2,09, valin 1,00, metionin 1,03, tyrosin 1,03, fenylalanin 0,98, β -alanin 0,93, ornitin 1,11, lysin 1,95, histidin 0,97, arginin 3,07. Tryptofa/tyrosin-forholdet i det intakte peptid ble bestemt spektrofotometrisk til 1,15.

Eksempel 2(a) t-butylloksykarbonyl- β -alanin

β -alanin (8,91 g) blir løst i 1N natriumhydroksyd (100 ml) og til denne løsning blir det tilsatt natriumhydrogenkarbonat (21,0 g) og dioksan (70 ml). Løsningen blir omrørt ved 50°C og en løsning av t-butylazidformat (17,2 g) i dioksan (30 ml) blir tilsatt dråpevis. Løsningen blir omrørt i 41,5 time ved 50°C og konsentrert under redusert trykk til omtrent 100 ml. Konsentratet blir avkjølt med is og justert til pH 2 ved tilsetning av 4N saltsyre (180 ml). Løsningen blir ekstrahert med is-kald etylacetat (ca. 100 ml), tørket over vannfri natriumsulfat og konsentrert under redusert trykk for å gi en sirupaktig rest. Resten blir rekrystallisert fra etylacetat-petroleumeter for å gi 12,66 g av det ønskede produkt, med smeltepunkt 77 til 78°C.

Analyse beregnet for $C_8H_{15}NO_4$: C = 50,78, H = 7,99, N = 7,40.
Funnet: C = 50,99, H = 8,06, N = 7,47.

(b) t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosin-metylester

L-tyrosin-metylester-hydroklorid (3,48 g) blir løst i vann (15 ml). Til løsningen blir det tilsatt 50% kaliumkarbonat (5 ml) under is-avkjøling og blandingen blir satt tilside på et kaldt sted i 40 min. De utskilte krystallene blir samlet ved filtrering, vasket omhyggelig med kaldt vann og tørket under redusert trykk for å gi 2,55 g av L-tyrosin-metylester.

På den annen side blir t-butylloksykarbonyl- β -alanin (1,89 g) løst i vannfri tetrahydrofuran, og løsningen blir avkjølt til -10°C. Til løsningen blir det langsomt tilsatt sukessivt tri-n-butylamin (2,04 g) og etylklorformat (1,19 g) under omrøring. Etter ti min. blir det tilsatt en suspensjon av det ovenfor fremstilte L-tyrosin-metylester (1,95 g) i vannfri tetrahydrofuran (20 ml). Blandingen blir omrørt ved -10°C i 30 min. og ved rom-

temperatur i 2,5 timer og løsningsmidlet blir fjernet ved inndamping under redusert trykk. Den dannede rest blir løst i etylacetat, vasket suksessivt med 1N saltsyre, vann, 5% natriumhydrogenkarbonat og vann, og tørket over natriumsulfat. Etter fjernelse av løsningsmidlet ved inndamping under redusert trykk blir den dannede rest blandet med eter for å felle ut krystaller. Krystallene som skilles ut blir samlet ved filtrering og tørket under redusert trykk for å gi et utbytte av 2,99 g av det ønskede produkt. Rekrystallisering fra metanol-eter gir krystaller med smeltepunkt 141 til 142°C.

$$[\alpha]_D^{23} + 8,2 \pm 0,5^\circ \quad (c = 1,020, \text{ metanol}).$$

Analyse beregnet for $C_{18}H_{26}N_2O_6$: C = 59,00, H = 7,15, N = 7,65.
Funnet: C = 59,03, H = 7,12, N = 7,63.

(c) t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosin-hydrazid

t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosin-metylester (2,56 g) blir løst i vannfri etanol (26 ml). Hydrazin-hydrat (1,7 ml) blir tilsatt til løsningen og blandingen blir holdt ved romtemperatur i 5 timer og i et kaldt sted natten over. De dannede krystaller blir samlet ved filtrering, vasket med etanol og eter, tørket og gir et utbytte av 2,54 g av det ønskede produkt. Rekrystallisering fra varmt vann gir krystaller med smeltepunkt fra 213,5 til 215°C.
 $[\alpha]_D^{23} + 3,6 \pm 0,6^\circ \quad (c = 0,978, 50\% \text{ eddiksyre}).$

Analyse beregnet for $C_{17}H_{16}N_4O_5$: C = 55,72, H = 7,15, N = 15,29.
Funnet: C = 55,74, H = 7,11, N = 15,30.

(d) t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionin-metylester

t-butylloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosin-hydrazid (1,10 g) blir løst i kald 1N saltsyre (7,5 ml). Løsningen blir holdt ved ca. -10°C og kald 2M natriumnitrit (3,6 ml) blir tilsatt. Deretter

blir blandingen satt tilside for 4 min. og det dannede azid blir ekstrahert med eter, vasket med kald 1N natriumhydrogenkarbonat og tørket over vannfri natriumsulfat. Etter fjernelse av løsningsmidlet ved inndamping under redusert trykk ved en bad-temperatur av ca. 10°C blir den dannede rest løst i kald acetonitril. Til løsningen blir det tilsatt L-seryl-L-metionin-metylester (0,756 g (fremstilt i henhold til metoden beskrevet i Bull. Chem. Soc. Japan 39 1171 (1966))), og blandingen blir satt tilside i 48 timer. Etter fjernelse av løsningsmidlet ved inndamping under redusert trykk blir resten løst ved tilsetning av etylacetat og en liten mengde vann. Løsningen blir vasket suksessivt med kald 1N salt-syre, vann, 5% natriumhydrogenkarbonat og vann, og tørket over natriumsulfat. Etter fjernelse av løsningsmidlet ved inndamping under redusert trykk blir den dannede gelatin-aktige masse samlet ved filtrering, vasket med kald etylacetat og eter, og tørket for å gi det ønskede produkt med et utbytte av 1,204 g. Produktet blir rensed ved ny utfelling fra etylacetat, smeltepunkt 121,5 til 123°C. $[\alpha]_D^{23} = 13,0 \pm 0,6^\circ$ ($c = 0,997$, metanol).

Rf = 0,53 (silikagel tynn-skikts-kromatografering i et løsningsmiddelsystem av metanol-eddiksyre = 15:85 beregnet som volum).

Analyse beregnet for $C_{26}H_{40}N_4O_9S$: C = 52,41, H = 6,90, N = 9,58,
 Funnet: S = 5,48.
 C = 52,94, H = 6,85, N = 9,65,
 S = 5,48.

(e) t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionin-hydrazid

t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionin-metylester (0,969 g) blir løst i dimetylformamid (6 ml). Til løsningen blir det tilsatt hydrazinhydrat (0,5 ml) og blandingen blir satt tilside på et kaldt sted i omtrent 43 timer. Løsningen blir blandet med etylacetat og gir en gelatin-aktig masse, som blir samlet ved filtrering, vasket med kald etylacetat og tørket og gir et utbytte av 1,01 g av det ønskede produkt. En ny krystallisering fra vann gir krystaller med smeltepunkt 186,5 til 188°C.

$\alpha_D^{23} - 20,1 \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,346$, 50% metanol).

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

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

(f) t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionyl- γ -t-butyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin.

t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionin-hydrazid (0,452 g) blir løst i 90% dimetylformamid (4,5 ml) og løsningen blir avkjølt i et is-salt bad. Til løsningen blir det tilsatt is-kald 1N saltsyre (2,0 ml) og 1M natriumnitrit (0,825 ml) under omrøring. Etter ca. 4 min. blir det tilsatt en is-kald løsning (20 ml) mettet med natriumklorid og t-butyloksykarbonyl-tetrapeptidazidet blir ekstrahert med is-kald etylacetat. Ekstrakten blir vasket med is-kald 5% natriumhydrogenkarbonat og tørket over vannfri natriumsulfat.

γ -t-butyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycinacetat (0,496 g) (fremstilt i henhold til metoden beskrevet i Bull. Chem. Soc. Japan 38 1148 (1965)) og trietylamin (0,21 ml) blir løst i dimetylformamid (15 ml). Til denne løsning blir det tilsatt en løsning av det ovenfor fremstilte azid i etylacetat og etylacetat blir fjernet ved inndamping under redusert trykk ved en bad-temperatur av 10 - 15°C og gir en klar løsning, som blir satt tilside på et kaldt sted natten over. En ytterligere mengde av azidet fremstilt fra tetrapeptidhydrazid (0,226 g), som nevnt ovenfor, blir tilsatt til løsningen og blandingen blir satt tilside natten over på et kaldt sted.

Deretter blir løsningen tilsatt dråpevis til is-kald etylacetat (200 ml) under omrøring. Den dannede utfelling blir samlet ved filtrering og gir 0,691 g av det urene dekaeptid-derivatet, som blir utfelt på nytt fra dimetylformamid-metanol (2:5 beregnet som volum) og lyofilisert fra eddiksyre og gir et pulver i et

utbytte av 0,454 g.

En silikagel tynn-skikts-kromatografering av produktet gir en enkel topp med Rf-verdi (0,54 til 0,57). Produktet har en spesifikk optisk dreining av $[\alpha]_D^{23} = 19,4 \pm 0,7^\circ$ ($c = 0,882$, dimetylformamid).

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

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

På lignende måte som beskrevet i eksempel 1 (k) blir t-butyloksykarbonyl- β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionyl- γ -t-butyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin kondensert med N^ε-t-butyloksykarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^δ-t-butyloksykarbonyl-L-ornityl-N^ε-t-butyloksykarbonyl-L-lysyl-L-arginyl-L-argininamid og det dannede beskyttede oktadeka-peptid blir behandlet med hydrogenfluorid for å gi det avblokkerte oktadeka-peptid. Etter kromatografisk renselse av produktet β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-metionyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-ornityl-L-lysyl-L-arginyl-L-argininamid blir dette erholdt i en ren form. Dette produkt var identisk med oktadeka-peptidet fremstilt i eksempel 1 (k) med hensyn til $[\alpha]_D$, UV, aminosyreforhold og biologiske egenskaper.

Eksempel 3

β -Ala¹, Orn¹⁵-ACTH(1-18)-NH₂-acetat (0,5 mg) blir løst i 40 mM sinkklorid (0,25 ml) ved romtemperatur, og til denne løsning blir det tilsatt en løsning (0,25 ml) av 40mM dinatriumhydrogenfosfat inneholdende natriumklorid (4,5 mg). Således oppnås en suspensjon av det ønskede kompleks og dette blir justert til pH 7,0 ved tilsetning av 0,1N natriumhydroksyd.

137152

Eksempel 4

β -Ala¹, Orn¹⁵-ACTH(1-18)-NH₂-acetat (0,5 mg) blir løst i destillert vann (0,15 ml). Til løsningen blir det tilsatt en løsning (0,1 ml) av poly-L-glutaminsyre (0,5 mg ; molekylvekt ca. 1.500 - 2.000) som forut har blitt nøytralisert med 0,1N natriumhydroksyd. Blandingen blir omrørt i flere minutter og til denne blir det tilsatt en løsning (0,25 ml) av M/30 fosfat-buffer som inneholder natriumklorid (4,5 mg). Det dannede kompleks blir justert til pH 7,0 ved tilsetning av 0,1N natriumhydroksyd.

Eksempel 5

β -Ala¹, Orn¹⁵-ACTH(1-18)-NH₂-acetat (1,0 mg) blir løst i destillert vann (0,2 ml). Til løsningen blir det tilsatt under omrøring en løsning av poly-L-aspartinsyre (2 mg; molekylvekt ca. 3.000) som har blitt nøytralisert med 0,1N natriumhydroksyd, (0,3 ml) for bruk, og således dannes en suspensjon av en hvit utfelling. Den ønskede suspensjon av komplekset blir fremstilt ved å tilsette til suspensjonen en løsning (0,5 ml; pH 6,8) av M/15 dinatriumhydrogenfosfat/kaliumdihydrogenfosfat inneholdende natriumklorid (9,0 mg) og å justere pH i suspensjonen til 7,0 med 0,1N natriumhydroksyd.

Eksempel 6

β -Ala¹, Orn¹⁵-ACTH(1-18)-NH₂-acetat (0,5 mg) blir løst i 100 mM sinkklorid (0,15 ml). På den annen side blir poly-L-glutaminsyre (0,5 mg; molekylvekt ca. 2.000 - 3.000) nøytralisert med 0,1N natriumhydroksyd (0,1 ml) og til løsningen blir det tilsatt natriumklorid (4,5 mg) og 40 mM dinatriumhydrogenfosfat (0,25 ml). Således dannede løsninger blir blandet og omrørt ved romtemperatur for å danne en suspensjon av det ønskede kompleks, og dette blir nøytralisert med en passende mengde av 0,1N natriumhydroksyd.

Eksempel 7

$\angle \beta\text{-Ala}^1$, Orn 15 $\angle$ -ACTH(1-18)- NH_2 -acetat (0,5 mg) blir løst i vann (0,1 ml) ved romtemperatur og til dette blir det tilsatt M/15 kaliumdihydrogenfosfat-dinatriumhydrogenfosfat (0,25 ml) som inneholder 4,5 mg av natriumklorid. Kopoly-L-glutamyl-L-tyrosin (2,0 mg) (molekylvekt 21.850) blir nøytralisert ved tilsetning av 0,1N natriumhydroksyd (0,15 ml). Den nøytraliserte løsning blir tilsatt til det ovenfor fremstilte peptid og blandingen blir omrørt for å danne en suspensjon av det ønskede kompleks, og denne blir justert til pH 7,0 med 0,1N natriumhydroksyd.

Eksempel 8

$\angle \beta\text{-Ala}^1$, Orn 15 $\angle$ -ACTH(1-18)- NH_2 -acetat (0,5 mg) blir løst i vann (0,1 ml) og til denne blir det tilsatt M/15 fosfatbuffer (0,25 ml) som inneholder 4,5 mg av natriumklorid. Kopoly-L-glutamyl-L-tyrosin (7 mg; molekylvekt ca. 21.850) blir nøytralisert med 0,1N natriumhydroksyd. Den nøytraliserte løsning (0,1 ml) blir tilsatt til løsningen av det ovenfor nevnte peptid for å gi en suspensjon som øyeblikkelig blir klar. Til løsningen blir det tilsatt timerosal (0,1 mg) i vann (0,05 ml) og den dannede klare løsning blir justert til pH 7,0 ved tilsetning av 0,1N natriumhydroksyd.

PATENTKRAV

Analogifremgangsmåte for fremstilling av kortikotrope oktadekapeptider representert ved følgende formel: $\beta\text{-alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-X-Y-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-ornityl-L-lysyl-L-arginyl-Z}$, hvori X er en L-metionin-, L-norvalin-, L-norleucin-, L-leucin- eller α -aminosmørsyrerest; Y er en L-glutaminsyre- eller L-glutaminrest og Z er en L-arginin-, L-argininamid- eller L-argininesterrest; ikke-giftige syreaddisjonssalter eller komplekser derav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t e t beskyttet deka-peptid med formel: $R_1\text{-}\beta\text{-alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-X-Y-R}_2\text{-L-}$

137152

glutamyl-L-histidyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycin, hvori R_1 er en amino-beskyttende gruppe; X har den ovennevnte betydning og R_2 er en karboksyl-beskyttende gruppe, omsettes med et beskyttet oktadekapeptid av formel: $N^\epsilon-R_3$ -L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl- $N^\delta-R_4$ -L-ornityl- $N^\epsilon-R_5$ -L-lysyl-L-arginyl-Z, hvori R_3 , R_4 og R_5 hver er en amino-beskyttende gruppe og Z har den ovennevnte betydning, ved den aktiverte estermetode, dicykloheksylkarbodiimid-metoden, azidmetoden, metoden med blandede anhydrider eller er kombinasjon derav, og beskyttende grupper fjernes (avblokkeres) fra det dannede beskyttede oktadekapeptid med formel: R_1 - β -alanyl-L-tyrosyl-L-seryl-X- γ - R_2 -L-glutamyl-L-histidyl-L-fenyl-alanyl-L-arginyl-L-tryptofyl-glycyl- $N^\epsilon-R_3$ -L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl- $N^\delta-R_4$ -L-ornityl- $N^\epsilon-R_5$ -L-lysyl-L-arginyl-Z, hvori R_1 , X, R_2 , R_3 , R_4 , R_5 og Z har de ovennevnte betydninger ved hydrogenolyse, acidolyse, alkalisk forsepning, hydrazinolyse eller reduksjon med natrium i flytende ammoniakk, og om ønsket omdannes det dannede (avblokkerte) oktadekapeptid til syreaddisjonssalter eller komplekser derav på i og for seg kjent måte.