



Patentdirektoratet  
: TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5394/83

(51) Int.Cl.5

C 07 K 7/06

(22) Indleveringsdag: 25 nov 1983

(41) Alm. tilgængelig: 27 maj 1984

**(44) Fremlagt: 10 maj 1993**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 26 nov 1982 GB 8233837

(71) Ansøger: **\*NYEGAARD & CO. A/S; Nycoveien 2; Oslo 4, NO**

(72) Opfinder: Ole Didrik \*Lærum; NO

(74) Fuldmægtig: **Kontor for Industriel Eneret**

**(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af peptider og deres fysiologisk acceptable salte, samt mellemprodukt hertil**

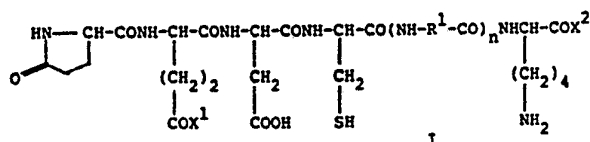
**(56) Fremdragne publikationer**

**(57) Sammendrag:**

5394-83

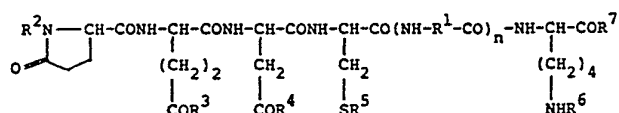
### Fremgangsmåde til fremstilling af peptider.

### Peptidforbindelse med den almene formel



hvor  $R^1$  er resten af glycin eller D-alanin, og alle andre tilstedeværende aminosyrerester er i L-form,  $X^1$  og  $X^2$ , der er ens eller forskellige, hver betegner OH eller  $NH_2$  og n er tallet 0 eller 1, eller fysiologisk acceptable salte deraf fremstilles ved fjernelse af beskyttelsesgrupperne fra et beskyttet derivat af forbindelsen I, navnlig en forbindelse med formlen

fortsættes



II

hvor  $\text{R}^2$  og  $\text{R}^6$  er aminbeskyttelsesgrupper eller hydrogen,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$  og  $\text{R}^5$  er  $\text{NH}_2$ , beskyttede aminogrupeer eller karboxylbeskyttelsesgrupper eller OH og  $\text{R}^5$  en tiolbeskyttende gruppe.

Forbindelserne har evne til selektivt at forhindre hvilende stammeceller for hæmopoiese i at blive induceret til at indtræde i celledelingscyklus og antages at være analoge med en naturligt forekommende granulopoiese-inhibitionsfaktor der er fundet i små mængder i knoglemarvsekstrakter. De kan derfor bruges til beskyttelse af stammeceller for hæmopoiese mod angreb af cytotoxiske lægemidler som angriber kræftceller i mitose eller S-fase.

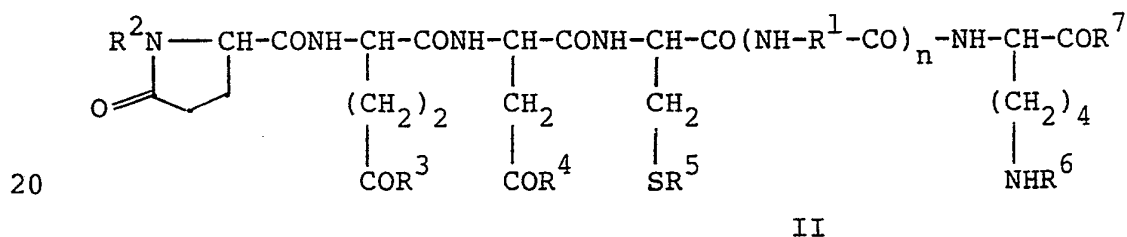
De kan desuden bruges til fremstilling af materiale til immunologiske prøveteknikker.



de modne celler, fx erythrocytter eller granulocytter, kan ikke længere dele sig. Da de modne celler kontinuerlig dør er det derfor afgørende at den proliferative evne hos de mindre modne celler, navnlig hos de pluripotente stammeceller, oprethol-

Des.  
Det har nu vist sig at visse peptider har evne til selektivt at forhindre hvilende stammeceller i at blive sat igang til celledelingscyklus. Peptiderne antages at være analoge til en naturligt forekommende granulopoiese-inhibitionsfaktor som er blevet fundet i ganske små mængder i knoglemarvsekstrakter.

I overensstemmelse hermed er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved, at beskyttelsen fjernes fra et beskyttet derivat af forbindelsen med formel I, idet det beskyttede derivat har formlen II



hvor  $\text{R}^1$  er som defineret ved formel I,  $\text{R}^2$  og  $\text{R}^6$  er aminbeskyttende grupper eller hydrogenatomer,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$  og  $\text{R}^7$  hver er  $\text{NH}_2$ , en beskyttet aminogruppe eller en karboxylbeskyttende gruppe eller OH og  $\text{R}^5$  er en tiolbeskyttende gruppe, hvorpå den således dannede forbindelse med formlen I om ønsket omdannes til et fysiologisk acceptabelt salt heraf.

Fysiologisk acceptable salte af de ifølge opfindelsen fremstillede peptider indbefatter syreadditionssalte såsom hydroklorider, hydrobromider og sulfater såvel som salte med base såsom alkalimetalsalte, fx natrium- eller kaliumsalte, jordalkalimetalsalte, fx kalciumsalte og aminsalte.

Aminosyreresten i anden stilling fra den N-terminale ende synes at være kritisk eftersom peptidet pyroGlu-Asp-Asp-Cys-LysOH, der var blevet postuleret at være den naturligt forekommende granulopoiese-inhibitionsfaktor, viste sig at  
5 være inaktiv. På grund af de små bitte til rådighed stående mængder af den naturlige granulopoiese-faktor er strukturen af det naturlige stof ikke blevet bestemt. Det er aldrig blevet udvundet i krystallinsk eller fuldstændig ren form og det vides ikke om en sådan udvinding kunne opnås ved hjælp af ma-  
10 teriale kun fra naturlige kilder. I modsætning hertil kan peptiderne med den almene formel I vindes i krystallinsk form der egner sig til farmaceutisk brug og i forholdsvis store mængder, fri for forurenende peptider og proteiner af naturlig oprindelse.

15 De foretrukne, ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser er

- 1) L-pyroGlutamyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-L-lysin,
- 2) L-pyroGlutamyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-glycyl-  
20 L-lysin,
- 3) L-pyroGlutamyl-L-glutaminyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-L-lysin,
- 4) L-pyroGlutamyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-D-alanyl-L-lysin og
- 25 5) L-pyroGlutamyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-L-lysinamid.

Forbindelserne med den almene formel I har tendens til at udvise et komplekst aktivitetsmønster som åbenbart er dosisafhængigt. I særdeleshed udviser forbindelse nr. 1) ved injek-  
30 tion i mus ved forholdsvis lav dosis en selektiv inhibering af det myelopoietiske system, nemlig inhibering af de morfologisk genkendelige celler og "formålsbestemte" stammeceller, mens andre celle-"slægter" stammende fra de pluripotente stammeceller ikke påvirkes. Ved en koncentration på  $10^{-7}$  M i den  
35 ekstracellulære væske er der en udtalt nedgang i antallet af perifere granulocytter, der er størst blandt de modne celler.

Efter én injektion på  $10^{-5}M$  synes hovedvirkningen at indtræde på de "formålsbestemte" stammeceller. Ved højere doser, fx injektioner på  $10^{-5}M$  i seks på hinanden følgende dage, sker der stadig en stærk reduktion i populationen af formålsbestemte stammeceller, men også de pluripotente stammeceller og produktionen af erythrocyter er nedsat. Ved  $10^{-5}M$  i tre uger iagttages der kraftig stimulering af hele det hæmopoietiske system, herunder produktion af lymfocytter. Lignende resultater udvises af forbindelser nr. 2)-5) omend der er svagt anderledes styrkegrader.

Det skal bemærkes at der ikke er nogen inhiberende virkning på cellerne i andre væv og specielt ikke på svulstceller med relation til ikke-myelopoietiske væv. Der sker således en selektiv beskyttelse af det myelopoietiske system. Imidlertid udøver peptiderne en beskyttende virkning på kræftceller med relation til det myelopoietiske system, fx myeloleukæmiceller, og disse forbindelser kan ikke bruges selektivt til behandling af sådanne kræftformer.

Peptiderne er uden signifikant toxicitet. Hidtil har alle iagttagne hæmatologiske virkninger været reversible og ingen makroskopiske ændringer er blevet iagttaget i de andre organer hos dyr hvori disse peptider er blevet injiceret.

Som nævnt ovenfor har inhibering af hæmopoiese og specielt granulopoiese tendens til at forhindre hvilende celler i at indtræde i celledeling og dermed blive følsomme for angreb af cytotoxiske anti-cancerlægemidler, fx cytosinarabinosid.

Det har vist sig at efter behandling med et peptid fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen såsom forbindelsen nr. 1) er den inhiberende virkning på de myelopoietiske celler ikke slet og ret reversibel, men faktisk forøges produktionen af sådanne celler midlertidigt abnormt således at den normale cellepopulation meget hurtigt retableres og endda midlertidigt bliver overdreven.

Foruden den ovennævnte beskyttende funktion i terapien med anvendelse af cytotoxiske lægemidler, kan de omhandlede peptider også bruges til at standse eller bremse formering af

kræftceller med relation til det myelopoietiske system, fx ved behandling af myeloleukæmi. Peptiderne kan bruges i en hvilken som helst klinisk situation hvor det er ønskeligt at ændre hæmopoiesen. I nogle tilfælde kan de omhandlede pepti-  
5 der også bruges i relative høje doser for at stimulere det myelopoietiske system hvor dette er utilstrækkelig aktivt.

Eftersom peptiderne med formel I har vist sig at udøve en vis indflydelse på beslægtede ikke-myeloide celler såsom lymfopoiese kan de også bruges til selektiv modifikation af  
10 celleformering i andre organer.

Generelt kan de omhandlede peptider, for at udøve beskyttende virkning mod cytotoxiske lægemidler, indgives til mennesker ved injektion i dosisområdet 1-10 mg, fx 4-5 mg pr. 70 kg legemsvægt om dagen. Hvis forbindelserne indgives ved  
15 infusion ved lignende teknik kan dosis være i området 30-300 mg pr. 70 kg legemsvægt, fx ca. 100 mg over seks dage. I princippet er det ønskeligt at frembringe en koncentration af peptidet på omkring  $10^{-9}$  M til  $10^{-4}$  M i patientens ekstracellulære væske.

20 I almindelighed fordrer kombineret terapi med cytotoxiske lægemidler såsom cytosinarabinosid omhyggelig tidsberegning for at sikre at det myelopoietiske system beskyttes mens det cytotoxiske lægemiddel stadig er til stede.

Forbindelserne med den almene formel I kan indgå i farmaceutiske præparater der indeholder mindst én sådan forbindelse som virksom bestanddel eller et fysiologisk kompatibelt salt deraf sammen med et farmaceutisk bærestof eller excipient. Sådanne præparater kan fx oparbejdes i former egnet til oral, nasal, parenteral eller rektal indgift.

30 I nærværende beskrivelse indbefatter udtrykket "farmaceutisk" veterinære anvendelser af de omhandlede forbindelser.

Forbindelserne kan foreligge i konventionelle, farmakologiske indgiftsformer såsom tabletter, overtrukne tabletter, næsesprøjtepræparater, opløsninger, emulsioner, pulvere, kapsler eller former til forsinket frigivelse. Konventionelle  
35 farmaceutiske excipienter såvel som de sædvanlige fremstillings-

måder kan bruges til fremstilling af disse former. Tabletter kan fx fremstilles ved sammenblanding af den eller de virksomme bestanddele med kendte excipienter, fx med fortyndingsmidler såsom kalciumkarbonat, kalciumfosfat eller laktose, desintegreringsmidler såsom majsstivelse eller alginsyre, bindemidler såsom stivelse eller gelatine, smøremidler såsom magniumstearat eller talkum og/eller midler til opnåelse af forsinket frigivelse såsom karboxypolymetylen, karboxymetylcellulose, celluloseacetatftalat eller polyvinylacetat.

10           Tabletterne kan eventuelt bestå af flere lag. Overtrukne tabletter kan fremstilles ved overtrækning af kerner, opnået på lignende måde som tabletterne, med midler der almindeligt bruges til tabletovertrækning, fx polyvinylpyrrolidon eller shellak, gummi arabikum, talkum, titandioxyd eller sukker.

15   For at opnå forsinket frigivelse eller undgå uforenelighedsproblemer kan kernen også bestå af flere lag. Tabletovertrækket kan også bestå af flere lag for at opnå forsinket frigivelse, i hvilket tilfælde der kan bruges de ovennævnte excipienter for tabletter.

20           Injektionsopløsninger kan fx fremstilles på konventionel måde, fx ved tilsætning af konserveringsmidler såsom p-hydroxybenzoater, eller stabilisatorer såsom EDTA. Derefter indfyldes opløsningerne i injektions-hætteglas eller ampuller.

          Nesesprøjtepræparater kan oparbejdes på tilsvarende  
25   måde i vandig opløsning og pakkes i sprøjtebeholdere enten med et aerosol-drivmiddel eller forsynet med midler til manuel udstødning. Kapsler indeholdende en eller flere virksomme bestanddele kan fx fremstilles ved blanding af det virksomme stof med inerte bærestoffer såsom laktose eller sorbitol og  
30   indfyldning af blandingen i gelatinekapsler.

          Egnede suppositorier kan fx fremstilles ved sammenblanding af det virksomme stof eller kombinationer af virksomme stoffer med de konventionelle bærestoffer der bruges til dette formål, fx naturlige fedtstoffer eller polyætylenglykol eller  
35   derivater deraf.



Dosisenheder indeholdende forbindelsen med den almene formel I indeholder fortrinsvis 1-10 mg, fx 4-5 mg af det omhandlede peptid.

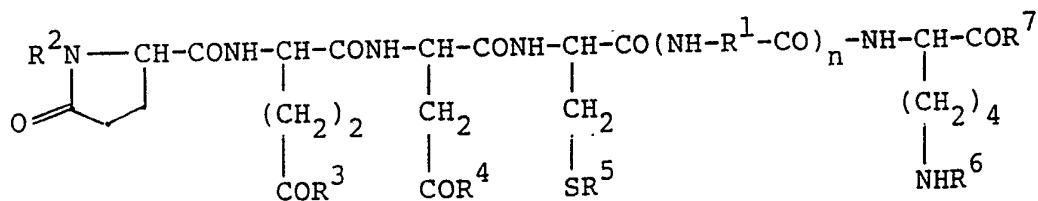
Inhibering af hæmopoiese ved hjælp af de omhandlede forbindelser sker ved at man til en person eller et dyr administrerer en effektiv mængde af et farmaceutisk præparat som beskrevet foran.

En yderligere vigtig anvendelse af disse peptider er imidlertid til fremstilling af materiale til immunologisk prøveteknik. Peptidet kan herved kovalent bindes til et passende højmolekylært bærestof såsom albumin, polysin eller polyprolin med henblik på at blive injiceret i antistofdannende dyr, fx kaniner, marsvin eller geder. Antisera med høj specificitet opnås ved anvendelse af velkendt absorptionsteknik ved hjælp af den højmolekylære bærer. Ved at indføre radioaktivitet ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) i peptidmolekylet kan der let udformes en radioimmunologisk bestemmelsesteknik, og den kan anvendes til bestemmelse af peptid i de forskellige biologiske væsker såsom serum (plasma), urin og cerebrospinalvæske.

De omhandlede peptider kan syntetiseres på en hvilken som helst hensigtsmæssig måde. I almindelighed vil de tilstedeværende reaktive grupper (amino, tiol og/eller karboxyl) være beskyttet under den fulde syntese, og sluttrinnet vil således være fjernelse af beskyttelsen fra et beskyttet derivat med formel I. Normalt vil alle  $-\text{COOH}$ -grupper alle  $-\text{NH}_2$ -grupper,  $-\text{NH}$ -gruppen i pyroglutamylresten og  $-\text{SH}$ -gruppen i cysteinyresten være beskyttet.

Det beskyttede peptidderivat er ejendommeligt ved, at det har den almene formel II

30



35

II

hvor

$R^1$  er som defineret ovenfor;

$R^2$  og  $R^6$  er, uafhængigt af hinanden, hydrogen eller en karbobenzoxo-, trityl-, t-butoxykarbonyl-, aretyl- eller formylgruppe;

5  $R^3$ ,  $R^4$  og  $R^7$  er, uafhængigt af hinanden, en amino-, benzoxykarbonylamino-, tritylamino-, t-butoxykarbonylamino-, acetylamino-, formylamino-, hydroxy-, benzyloxy-, p-nitrobenzyloxy- eller 1-butyloxygruppe; og

$R^5$  er en metoxybenzyl- eller sulfoetylgruppe.

10 Der kendes et stort antal beskyttelsesgrupper for aminosyrer, og de er bl.a. eksemplificeret i E. Schröder og K. Lübke "The Peptides", bind 1 og 2, Academic Press, New York og London, 1965 og 1966; G.R. Pettit "Synthetic Peptides", bind 1-4, Van Nostrand, Reinhold, New York 1970, 1971, 1975 og 1976, Houben-  
15 Weyl "Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden", bind 15, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974; og "Amino Acids, Peptides and Proteins", bind 4-8, The Chemical Society, London 1972, 1974, 1975 og 1976.

Eksempler på aminbeskyttende grupper som kan anvendes  
20 er bl.a. karbobenzoxo (i det følgende også betegnet Z), trityl, t-butoxykarbonyl (i det følgende også betegnet Boc) og acylgrupper som fx en acetylgruppe eller en formylgruppe.

Eksempler på karboxylbeskyttende grupper der kan anvendes er bl.a. let fraspaltelige estergrupper såsom benzyl (i  
25 det følgende betegnet Bz), p-nitrobenzyl og t-butyl.

Eksempler på egnede tiolbeskyttende grupper er p-metoxybenzyl og sulfoetyl.

Det vil forstås at der eksisterer et stort antal andre sådanne grupper, som fx udførligt omtalt i ovennævnte litteraturreferencer, og anvendelse af alle sådanne grupper i de foran  
30 beskrevne processer ligger inden for opfindelsens rammer.

Karboxylbeskyttende grupper kan indføres ved konventionelle metoder, fx ved omsætning med et passende forestringsmiddel såsom en alkohol såsom benzyl- eller p-nitrobenzylalkohol i  
35 nærværelse af syre, fx p-toluensulfonsyre.

Aminbeskyttende grupper kan indføres ved konventionelle metoder, fx ved omsætning med passende syrehalogenider såsom karbobenzoxylchlorid eller pivaloylchlorid, eller med syreanhy-

drider såsom eddikesyreanhydrid.

Tiolbeskyttende grupper kan indføres ved omsætning med passende S-forætringsmidler såsom p-metoxybenzylchlorid eller sulfoætylbromid.

5           Der eksisterer mange forskellige fremgangsmåder til fjernelse af amin- og karboxylbeskyttende grupper. Således kan fx en aminbeskyttende gruppe fjernes ved acidolyse, hydrogenolyse, behandling med tyndt ammoniumhydroxyd, behandling med natrium, behandling med natriumamid, behandling med hydra-  
10   zin eller enzymatisk hydrolyse med fx leucinaminopeptidase. Metoder som er af interesse indbefatter også behandling med vandfrit hydrogenbromid, fx i iseddikesyre, behandling med trifluoreddikesyre, behandling med flydende hydrogenfluorid og katalytisk hydrogenering.

15           Således kan karbobenzoxygrupper og t-butoxykarbonylgrupper fjernes fx ved anvendelse af vandfrit hydrogenbromid, hensigtsmæssigt i nærværelse af iseddikesyre, eller ved hjælp af trifluoreddikesyre. Acylgrupper kan fx fjernes ved konventionel hydrolyse med syre eller ved enzymatisk hydrolyse som  
20   beskrevet ovenfor.

Fjernelse af karboxylbeskyttende grupper kan udføres ved forsæbning, acidolyse, hydrogenolyse eller enzymatisk hydrolyse. Således kan fx forsæbning udføres med et alkalimetalhydroxyd, hensigtsmæssigt i nærværelse af vand, en alkohol  
25   og/eller acetone. Acidolyse kan fx udføres ved hjælp af vandfrit hydrogenbromid eller trifluoreddikesyre og hydrogenolyse kan fx udføres ved katalytisk hydrogenering, fx ved hjælp af palladium på kul, hensigtsmæssigt 10% palladium på trækul. Enzymatisk hydroloyse kan fx udføres ved anvendelse af leucin-  
30   aminopeptidase. Således kan fx benzyl- og p-nitrobenzylgrupper fjernes ved hydrogenolyse og t-butylgrupper fx ved sur hydrolyse.

Amin-, hydroxyl- og karboxylbeskyttende grupper kan fx fjernes samtidig ved acidolyse, alkalisk hydrolyse, hydrogenolyse, behandling med natrium eller natriumamid eller ved  
35   enzymatisk hydrolyse. Sådanne metoder indebærer behandling med hydrogenbromid, hensigtsmæssigt i nærværelse af iseddikesyre, og behandling med alkohol, hensigtsmæssigt indeholdende

tørt hydrogenklorid opløst deri.

Tiolbeskyttende grupper såsom p-metoxybenzylgrupper kan fjernes ved hjælp af hydrogenfluorid ved lav temperatur, fx 0°C, fordelagtigt i nærværelse af et rensende middel såsom  
5 merkaptoætanol, cystein eller metionin. Denne metode kan fjerne amino-, karboxyl- og tiolbeskyttende grupper på en gang.

En fremgangsmåde til selektiv beskyttelsesfjernelse består fx i katalytisk hydrogenering, hensigtsmæssigt ved hjælp af palladium på fx kul som katalysator, og hensigts-  
10 mæssigt i nærværelse af et opløsningsmiddel såsom vand, metanol, dioxan, eddikesyre eller t-butanol. Ved denne fremgangsmåde fjernes fx karbobenzoxxygruppen, mens t-butoxykarbonylgruppen eller en acylgruppe efterlades intakt.

Generelt kan de beskyttede derivater af forbindelser  
15 med den almene formel I fremstilles ved de teknikker der egner sig til peptidsyntese. Man kan begynde ved den C-terminale ende ved omsætning af et passende beskyttet derivat af lysin med et passende beskyttet derivat af cystein, eller hvis  $n=1$ , forbindelsen  $\text{NH}_2\text{R}^1\text{COOH}$ . Lysinderivatet vil indeholde en  
20 fri  $\alpha$ -aminogruppe, mens den anden reaktant vil indeholde enten en fri eller en aktiveret karboxylgruppe og en beskyttet aminogruppe. Efter koblingen kan mellemproduktet renses, fx ved kromatografering, hvorpå N-beskyttelsesgruppen kan fjernes for at muliggøre addition af yderligere en aminosyrerest. Den-  
25 ne fremgangsmåde vil fortsættes indtil hele den udkrævede aminosyresekvens er fuldstændiggjort. N-beskyttelsesfjernelse vil normalt blive udført ved en mild acidolyse; overskydende syre neutraliseres normalt før det næste sammenkoblingstrin, fx ved hjælp af en base såsom triætylamin.

30 Det er også muligt at begynde ved den N-terminale ende og omsætte et passende beskyttet glutaminsyrederivat eller pyroglutaminsyrederivat, fortrinsvis indeholdende en aktiveret karboxylgruppe, med et passende beskyttet derivat af glutaminsyre eller glutamin. Efter koblingen kan produktet renses,  
35 fx ved kromatografering, og den terminale  $\alpha$ -karboxylgruppe befris for beskyttelsesgruppen og aktiveres eventuelt før det næste koblingstrin. Denne trinfølge gentages indtil det ønskede peptid er fuldstændiggjort.

Karboxylsyreaktiverende substituenten der fx kan anvendes indbefatter blandede anhydrider, azider og aktiverede estere som fx p-nitrofenylesteren, 2,4,5-triklorfenylesteren, N-hydroxybenzotriazolesteren og N-hydroxysuccinimidylesteren.

5 I almindelighed er det hensigtsmæssigt at udføre koblingsreaktionerne ved lave temperaturer, fx ved fra  $-20^{\circ}\text{C}$  op til stuetemperatur, hensigtsmæssigt i et passende opløsningsmiddelssystem som fx tetrahydrofuran, dioxan, dimetylformamid, metylenklorid eller en blanding af to eller flere af disse  
10 opløsningsmidler.

Koblingen af frie amino- og karboxylgrupper kan fx udføres ved hjælp af dicyklohexylkarbodiimid (DCC). Et andet koblingsmiddel der fx kan bruges er N-ætoxykarbonyl-2-ætoxy-1,2-dihydroquinolin.

15 Det kan være mere hensigtsmæssigt at udføre syntesen på en fastfase-harpiksbærer. Klormetyleret polystyren (tværbundet med 1% divinylbenzen) er en nyttig type bærer; i dette tilfælde vil syntesen begynde ved C-terminalen ved kobling af N-beskyttet lysin til bæreren. Når  $X^2$  skal være  $\text{NH}_2$  foretrækkes det at bruge en harpiksbærer der indeholder benzhydryl-  
20 aminer; disse kobles først til lysinkarboxylgruppen og den endelige spaltning, fx med HF, giver det ønskede amid.

De følgende eksempler tjener til nærmere belysning af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

25 Opløsningsmidler gendestilleredes fra kommercielt materiale og oplagredes på følgende måde: dimetylformamid (DMF) over molekylsigte 4A, diklormetan (DCM) over  $\text{CaCl}_2$ , triætylamin (TEA) over Na/Pb-legering (Baker) og trifluoreddikesyre (TFA) over molekylsigte 4A.

30

35

## Eksempel 1

-----  
L-Pyroglutamyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-L-lysin (forbindelse nr. 1)

a) t-Boc-(S-p-Metoxybenzyl)-L-cysteinyl-( $\epsilon$ -benzyloxykarbonyl)-  
5 L-lysin-benzylester (i)-----

406 mg  $\epsilon$ -benzyloxykarbonyl-lysin-benzylester-hydroklorid opløses i 3 ml DMF og der tilsættes TEA indtil der kan konstateres fri TEA i dampfasen med et fugtigt stykke pH-indikatorpapir. Til denne opløsning sættes der 491 mg t-Boc-(S-p-metoxybenzyl)-L-cystein-N-hydroxysuccinimidester opløst i 10 3 ml DMF. Ved passende tidsmellemlum tilsættes der portioner af TEA for at opretholde svag alkalinitet af opløsningen. Blandingen henstår natten over ved stuetemperatur og efter afprøvn-  
15 ning for negativ ninhydrinreaktion påføres den direkte på en 2,5 x 75 cm kolonne af "Sephadex" <sup>®</sup> LH-20, ekvilibreret med DMF og kalibreret med standardreaktanter (fx i dette eksempel t-Boc-( $\gamma$ -benzyl)-L-glutaminsyre-p-nitrofenylester og p-nitrofenol). Strømmen gennem kolonnen opretholdes som en gravitetsstrøm og effluenten overvåges ved 280 nm før opsamling af frak-  
20 tioner på hver ca. 10 ml. Produktet kan identificeres ved TLC af de enkelte fraktioner og de relevante fraktioner forenes og inddampes i vakuum. Udbytte 700 mg (100%) af et oliagtigt produkt som er homogent ved TLC (kloroform/acetone 9:1),  $R_f = 0,64$ .

25

b) t-Boc-( $\beta$ -Benzyl)-L-aspartyl-(S-p-metoxybenzyl)-L-cysteinyl-  
( $\epsilon$ -benzyloxykarbonyl)-L-lysin-benzylester (ii)-----

700 mg af det blokerede og beskyttede dipeptid (i), opløses i 25 ml vandfrit DMC og der tilsættes 25 ml vandfrit TFA. 30 Efter 30 minutter fjernes syre og opløsningsmiddel i vakuum. Remanensen opløses i DCM og inddampes på ny. Til en opløsning af remanensen i 3 ml DMF, der gøres svagt alkalisk med TEA, tilsættes der en opløsning af 488 mg t-Boc-( $\beta$ -benzyl)-L-asparaginsyre-p-nitrofenylester i 3 ml DMF. Alkaliniteten bør afprø-  
35 ves hyppigt og opretholdes ved tilsætning af små mængder TEA. Efter af ninhydrinreaktionen er blevet negativ (efter ca. 2

timer) påføres reaktionsblandingen på en "Sephadex" <sup>®</sup> LH-20 kolonne (2,5 x 75 cm) og renses som beskrevet foran. Udbytte efter inddampning i vakuum ca. 900 mg (100%) af et krystallinsk produkt, homogent ved TLC (kloroform/acetone 9:1),  $R_f = 0,70$ .

5

c) t-Boc-( $\gamma$ -Benzyl)-L-glutamyl-( $\beta$ -benzyl)-L-aspartyl-(S-p-metoxymethyl)-L-cysteinyloxy-( $\epsilon$ -benzyloxycarbonyl)-L-lysinebenzylester (iii)-----

900 mg af det blokerede tripeptidderivat (ii) afblokeres med TFA på den ovenfor beskrevne måde, opløses i 3 ml DMF og gøres svagt alkalisk med TEA. Til denne opløsning sættes der 504 mg t-Boc-( $\gamma$ -benzyl)-L-glutaminsyre-p-nitrofenylester i 3 ml DMF. Efter ca. 2,5 timer er ninhydrin-reaktionen blevet negativ og blandingen anbringes på en kolonne af "Sephadex" <sup>®</sup> LH-20 til rensning som beskrevet ovenfor. Adskillelsen af komponenterne i denne reaktionsblanding og dens overvågning ved TLC kan udføres som beskrevet ovenfor. De relevante fraktioner (nr. 9-15 i dette tilfælde) forenes, inddampes og tørres. Udbytte ~1140 mg (100%) af en lys gullig olie som er homogen ved TLC (kloroform/acetone 9:1),  $R_f = 0,53$ .

20

d) Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-( $\gamma$ -benzyl)-L-glutamyl-( $\beta$ -benzyl)-L-aspartyl-(S-p-metoxymethyl)-L-cysteinyloxy-( $\epsilon$ -benzyloxycarbonyl)-L-lysinebenzylester (iv)-----

25

1140 mg af tetrapeptidderivatet iii afblokeres ved TFA i DCM som beskrevet for (i) og opløses i 3 ml DMF. Opløsningen gøres svagt alkalisk med TEA og der tilsættes 423 mg benzyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsyre-p-nitrofenylester som en opløsning i 3 ml DMF. Reaktionsblandings alkalinitet bør kontrolleres gentagne gange og om nødvendigt retableres ved tilsætning af TEA. Efter ca. 3 timer bliver ninhydrinprøven negativ og pentapeptidderivatet iv kan renses som beskrevet ovenfor. Udbytte ~1230 mg (96%) lys gullig olie, homogen ved TLC (kloroform/acetone 9:1),  $R_f = 0,44$  (med "hale").

35

e) L-Pyroglutamyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-L-lysin

50 mg af det beskyttede pentapeptidderivat iv opløses i 50 ml flydende hydrogenfluorid ved 0°C under tilsætning af 500 mg metionin som rensningsmiddel, og henstår i 1 time. Hydrogenfluoridet afdampes derpå til tørhed i vakuum ved 0°C og reanensen omrøres med ætylacetat. Ætylacetat-vaskevæskerne dekanteres og kasseres. Det tilbageværende materiale opløses i tynd eddikesyre og frysetørres.

Det frysetørrede materiale, 2 mg, kan renses ved revers-fase-HPLC under anvendelse af en C18-kolonne, 10 mm x 10 cm, med en strømningshastighed på 2,8 ml pr. minut under anvendelse af gradienteluering med opløsning A: 0,1% vandig trifluoreddikesyre og opløsning B: 0,1% trifluoreddikesyre i acetonitril; der tilsættes 0,10% opløsning B i løbet af 30 minutter. Opdagelse udføres ved hjælp af ultraviolet absorption ved 214 nm eller ved hjælp af pyridindisulfidreagens (for SH-grupper).

Samme fremgangsmåde kan bruges til fremstilling af ovennævnte forbindelser nr. 2 til 5. Synteserne er anført i det følgende i skematisk form og produkternes karakteristika er givet i efterfølgende tabel. Der bruges følgende forkortelser:

|    |     |   |                                  |
|----|-----|---|----------------------------------|
|    | Boc | = | t-butoxykarbonyl                 |
|    | Bz  | = | benzyl                           |
|    | Z   | = | benzyloxykarbonyl (karbobenzoxo) |
| 25 | pMB | = | p-metoxybenzyl                   |
|    | Su  | = | N-hydroxysuccinimyl              |
|    | pNP | = | p-nitrofenyl.                    |



Forbindelse 1

|    | pGlu     | Glu               | Asp               | Cys               | Lys          |
|----|----------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|
|    |          |                   |                   | Boc — SpMB<br>OSu | H — Z<br>OBz |
| 5  |          |                   |                   | Boc — SpMB        | Z<br>OBz     |
|    |          |                   | Boc — OBz<br>OpNP | H — SpMB          | Z<br>OBz     |
|    |          |                   | Boc — OBz         | SpMB              | Z<br>OBz     |
| 10 |          | Boc — OBz<br>OpNP | H — OBz           | SpMB              | Z<br>OBz     |
|    |          | Boc — OBz         | OBz               | SpMB              | Z<br>OBz     |
|    | Z — OpNP | H — OBz           | OBz               | SpMB              | Z<br>OBz     |
| 15 | Z —      | OBz               | OBz               | SpMB              | Z<br>OBz     |
|    | H —      |                   |                   |                   | OH           |

Forbindelse 2

|    | pGlu     | Glu               | Asp               | Cys               | Gly      | Lys          |
|----|----------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|--------------|
| 20 |          |                   |                   |                   | Boc — OH | H — Z<br>OBz |
|    |          |                   |                   |                   | Boc —    | Z<br>OBz     |
|    |          |                   |                   | Boc — SpMB<br>OSu | H —      | Z<br>OBz     |
| 25 |          |                   |                   | Boc — SpMB        |          | Z<br>OBz     |
|    |          |                   | Boc — OBz<br>OpNP | H — SpMB          |          | Z<br>OBz     |
|    |          |                   | Boc — OBz         | SpMB              |          | Z<br>OBz     |
| 30 |          | Boc — OBz<br>OpNP | H — OBz           | SpMB              |          | Z<br>OBz     |
|    |          | Boc — OBz         | OBz               | SpMB              |          | Z<br>OBz     |
|    | Z — OpNP | H — OBz           | OBz               | SpMB              |          | Z<br>OBz     |
| 35 | Z —      | OBz               | OBz               | SpMB              |          | Z<br>OBz     |
|    | H —      |                   |                   |                   |          | OH           |

Forbindelse 3

|    | pGlu     | Gln        | Asp               | Cys               | Lys          |
|----|----------|------------|-------------------|-------------------|--------------|
| 5  |          |            |                   | Boc — SpMB<br>OSu | H — Z<br>OBz |
|    |          |            |                   | Boc — SpMB        | Z<br>OBz     |
|    |          |            | Boc — OBz<br>OpNP | H — SpMB          | Z<br>OBz     |
| 10 |          |            | Boc — OBz         | SpMB              | Z<br>OBz     |
|    |          | Boc — OpNP | H — OBz           | SpMB              | Z<br>OBz     |
|    |          | Boc —      | OBz               | SpMB              | Z<br>OBz     |
| 15 | Z — OpNP | H —        | OBz               | SpMB              | Z<br>OBz     |
|    | Z —      |            | OBz               | SpMB              | Z<br>OBz     |
|    | H —      |            |                   |                   | OH           |

Forbindelse 4

|    | pGlu     | Glu               | Asp               | Cys               | D-Ala    | Lys          |
|----|----------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|--------------|
| 20 |          |                   |                   |                   | Boc — OH | H — Z<br>OBz |
|    |          |                   |                   |                   | Boc —    | Z<br>OBz     |
| 25 |          |                   |                   | Boc — SpMB<br>OSu | H —      | Z<br>OBz     |
|    |          |                   |                   | Boc — SpMB        |          | Z<br>OBz     |
|    |          |                   | Boc — OBz<br>OpNP | H — SpMB          |          | Z<br>OBz     |
| 30 |          |                   | Boc — OBz         | SpMB              |          | Z<br>OBz     |
|    |          | Boc — OBz<br>OpNP | H — OBz           | SpMB              |          | Z<br>OBz     |
|    |          | Boc — OBz         | OBz               | SpMB              |          | Z<br>OBz     |
| 35 | Z — OpNP | H — OBz           | OBz               | SpMB              |          | Z<br>OBz     |
|    | Z —      | OBz               | OBz               | SpMB              |          | Z<br>OBz     |
|    | H —      |                   |                   |                   |          | OH           |

Forbindelse 5

|    | pGlu     | Glu               | Asp               | Cys               | Lys                      |
|----|----------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| 5  |          |                   |                   | Boc — SpMB<br>OSu | H — Z<br>NH <sub>2</sub> |
|    |          |                   |                   | Boc — SpMB        | Z<br>NH <sub>2</sub>     |
|    |          |                   | Boc — OBz<br>OpNP | H — SpMB          | Z<br>NH <sub>2</sub>     |
| 10 |          |                   | Boc — OBz         | SpMB              | Z<br>NH <sub>2</sub>     |
|    |          | Boc — OBz<br>OpNP | H — OBz           | SpMB              | Z<br>NH <sub>2</sub>     |
|    |          | Boc — OBz         | OBz               | SpMB              | Z<br>NH <sub>2</sub>     |
| 15 | Z — OpNP | H — OBz           | OBz               | SpMB              | Z<br>NH <sub>2</sub>     |
|    | Z —      | OBz               | OBz               | SpMB              | Z<br>NH <sub>2</sub>     |
|    | H —      |                   |                   |                   | NH <sub>2</sub>          |

| Forb.<br>(1) | Forb.<br>(2) | Forb.<br>(3) | Forb.<br>(4) | Forb.<br>(5) |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|

## I) TLC (silikagel)

Opløsningsmiddel

a) nBuOH/EtOAc/myresyre/vand  
1:1:1:1

|            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| $R_F=0,21$ | $R_F=0,19$ | $R_F=0,15$ | $R_F=0,22$ | $R_F=0,15$ |
|------------|------------|------------|------------|------------|

b) pyridin/EtOAc/HOAc/vand  
5:5:1:3

|            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| $R_F=0,07$ | $R_F=0,08$ | $R_F=0,08$ | $R_F=0,08$ | $R_F=0,14$ |
|------------|------------|------------|------------|------------|

## II) Aminosyreanalyse

Ala

-

-

-

1,01

-

Asp

1,00

1,00

1,00

1,00

1,00

81

Glu

1,98

1,91

1,87

1,94

1,87

Gly

-

0,98

-

-

-

Cys

0,98

0,90

0,90

0,89

0,88

Lys

1,04

1,09

0,98

1,09

1,00

## III) HPLC

C<sub>18</sub> 5 µm 125x4mm

DCF:214mm

RT 15,7

RT 16,7

RT 8,8

RT 18,3

RT 10,0

Flow:1ml/m

A:5mM fosforsyre

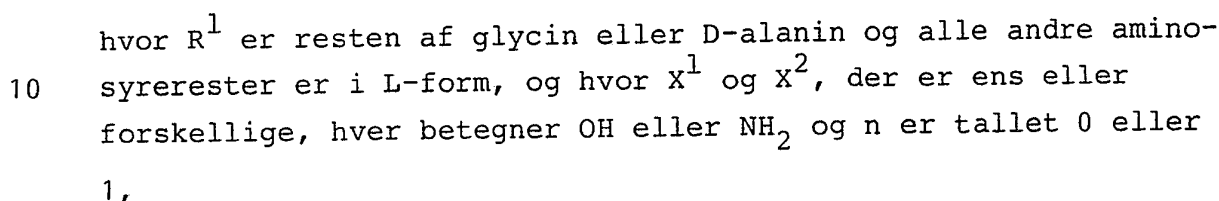
B:80% 5mM fosforsyre/20% CH<sub>3</sub>CNTid %B

0 0

18 20

30 100

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af et peptid med den almene formel



20

$$\begin{array}{ccccccccccc} R^2N-CH-CONH-CH-CONH-CH-CONH-CH-CO(NH-R^1-CO)_n-NH-CH-COR^7 \\ | \qquad \qquad | \qquad \qquad | \qquad \qquad | \qquad \qquad | \\ O \quad \quad \quad (CH_2)_2 \quad \quad CH_2 \quad \quad CH_2 \quad \quad (CH_2)_4 \\ \quad \quad \quad | \quad \quad \quad | \quad \quad \quad | \quad \quad \quad | \\ \quad \quad \quad COR^3 \quad \quad COR^4 \quad \quad SR^5 \quad \quad NHR^6 \end{array}$$

II

25 hvor  $R^1$  er som defineret ved formel I,  $R^2$  og  $R^6$  er aminbeskyttende grupper eller hydrogenatomer,  $R^3$ ,  $R^4$  og  $R^7$  hver er  $NH_2$ , en beskyttet aminogruppe eller en karboxylbeskyttende gruppe eller OH og  $R^5$  er en tiolbeskyttende gruppe,  
hvorpå den således dannede forbindelse med formlen  
I om ønsket omdannes til et fysiologisk acceptabelt salt  
30 heraf.

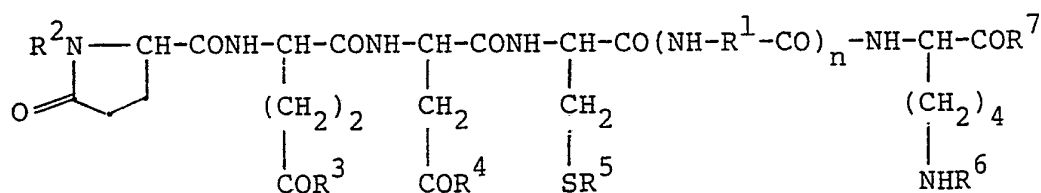
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved af der fremstilles L-pyroglutamyl-L-glutaminyl-L-aspartyl-L-

cysteinyl-L-lysin, L-pyroglutamyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-glycyl-L-lysin, L-pyroglutamyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-L-lysin, L-pyroglutamyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-D-alanyl-L-lysin eller L-pyroglutamyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-cysteinyl-L-lysinamid.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g-  
n e t ved at den fremstillede forbindelse foreligger i kry-  
stallinsk form.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t  
ved at beskyttelsesgrupperne fjernes ved sur hydrolyse, hy-  
drogenolyse, ammonolyse eller enzymatisk hydrolyse.

5. Beskyttet peptidderivat til brug ved fremgangsmåden ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at det har den almene formel II



II

hvor

$R^1$  er som defineret i krav 1;

25  $R^2$  og  $R^6$  er, uafhængigt af hinanden, hydrogen eller en karbobenzoxy-, trityl-, t-butoxykarbonyl-, acetyl- eller formylgruppe;

$R^3$ ,  $R^4$  og  $R^7$  er, uafhængigt af hinanden, en amino-, benzoxykarbonylamino-, tritylamino-, t-butoxykarbonylamino-, acetylamino-, formylamino-, hydroxy-, benzyloxy-, p-nitrobenzyloxy- eller 1-butyloxygruppe; og

R<sup>5</sup> er en metoxybenzyl- eller sulfoetylgruppe.