



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 09 019 T2** 2007.05.16

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 504 022 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 09 019.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB03/01949**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 725 369.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/093302**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.05.2003**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **13.11.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.02.2005**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **11.10.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.05.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 1/00** (2006.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

**C07K 14/75** (2006.01)

**C07C 271/22** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**0210184 03.05.2002 GB**

**0210185 03.05.2002 GB**

**0210183 03.05.2002 GB**

(73) Patentinhaber:

**Avecia Ltd., Blackley, Manchester, GB**

(74) Vertreter:

**derzeit kein Vertreter bestellt**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR**

(72) Erfinder:

**EVANS, John, David, Manchester M9 8ZS, GB;  
SIMPKIN, Steven, Dean, Grangemouth,  
Stirlingshire FK3 8XG, GB; WELLINGS, Alfred,  
Donald, Manchester M9 8ZS, GB; ATHERTON,  
Eric, Northwich, Cheshire CW8 2SA, GB**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PEPTIDAMIDEN DURCH SEITENKETTENANKNÜPFUNG AN EINER FESTPHASE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Diese Erfindung betrifft ein Verfahren für die Festphasen-Synthese von Peptidamiden und neue Peptidamide.

**[0002]** Zahlreiche Peptide fanden ihre Nützlichkeit als Therapeutika. Ein Peptid, das von besonderer Bedeutung ist, ist Eptifibatid, ein cyclisches Peptidamid, das sechs Aminosäuren und einen Mercaptopropionylrest enthält. Eptifibatid fungiert durch Binden an den Plättchenrezeptor Glycoprotein IIb/IIIa und Inhibieren der Plättchenaggregation, wodurch Blutgerinnsel verhindert werden. Eptifibatid ist der Wirkstoff in Integrelin™, das bei der Behandlung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom und jenen, die sich einem perkutanen koronaren Eingriff unterziehen, verwendet wird.

**[0003]** Ein Festphasenverfahren für die Herstellung von Eptifibatid ist in der US 5 318 899 beschrieben. Allerdings ist wie bei zahlreichen Peptiden die Hauptherausforderung bei Eptifibatid die Herstellung von ausreichend Material bei akzeptablen Kosten.

**[0004]** Peptide können durch Festphasen-Synthese synthetisiert werden, die vom Carboxy-terminalen Ende des Peptids unter Verwendung einer  $\alpha$ -Amino-geschützten Aminosäure ausgeht. Die zwei am meisten verwendeten Protokolle verwenden tert-Butyloxycarbonyl (Boc) oder 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) als Amino-Schutzgruppen.

**[0005]** Wenn eine Fmoc-Schutzstrategie angewandt wird, ist der bevorzugte Festphasen-Träger ein Polydimethylacrylamid- oder Polystyrolharz, derivatisiert mit einem 4-(2',4'-Dimethoxybenzyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxy (Fmoc-Rink-amid)-Binde- bzw. Verknüpfungsmittel. Die erste geschützte Aminosäure der Peptidsequenz kann an dieses Harz durch Umwandeln von deren Carboxylgruppe zu einem aktiven Ester, in der Regel durch Umsetzen mit N-Hydroxybenzotriazol (BtOH) in Gegenwart eines Aktivierungsmittels, wie Diisopropylcarbodiimid (DIC), angeheftet werden. Dieser schonende Aktivierungsschritt minimiert die Razemisierung von empfindlichen Resten, wie Cys und Trp (in dieser gesamten Patentbeschreibung werden standardmäßige drei- oder einbuchstabige Abkürzungen für Aminosäuren verwendet). Ferner kann die schonende Acidolyse dieses Peptidharzes sowohl zum Abspalten des Peptids von dem Harz als auch der Entschützung jeglicher Seitenketten-Schutzgruppen führen. Allerdings ist das Fmoc-Rink-Amid-Bindemittel ein teures Reagens, und dies schränkt dessen Verwendung in der Peptid-Synthese im kommerziellen Maßstab ein.

**[0006]** Eine alternative Strategie ist die Verwendung eines Harzes, welches eine 4-Hydroxymethylbenzoesäure-(HMB)-Bindungseinheit trägt. Diese derivatisierten Harze sind billiger als die mit dem Fmoc-Rink-Amid-Linker derivatisierten. Allerdings beinhaltet die Anheftung der ersten Aminosäure ein p-Dimethylaminopyridin-(DMAP)-katalysiertes Veresterungsprotokoll, das sowohl zu einer zufälligen Fmoc-Entfernung als auch einer Razemisierung von empfindlichen Aminosäuren führen kann (Atherton, E. et al. (1981) J. Chem. Soc. Chem. Commun. S. 336).

**[0007]** Peptide werden in der Regel zu den entsprechenden Amididen durch Ammonolyse/Aminolyse von harzgebundenen Peptidestern oder durch Synthese des Peptidamids unter Verwendung eines Amin-basierten Linkers, wie des Fmoc-Rink-Amidharzes, umgewandelt. Damit ist deren Herstellung auch durch die oben umrissenen Faktoren eingeschränkt.

**[0008]** Daher besteht Bedarf an einem Verfahren, durch welches Peptidamide, wie Eptifibatid, wirtschaftlich in hoher Reinheit im großen Maßstab hergestellt werden können.

**[0009]** Somit sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren für die Festphasen-Synthese von  $c[\text{Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys}]\text{-NH}_2$ , cyclisiert durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys und Mpr, vor, welches Folgendes umfasst:

- (i) Anheften der Thiol-Seitenkette von Fmoc-Cys-NH<sub>2</sub> an einen geeigneten reaktiven festen Träger;
- (ii) Durchführen einer Festphasen-Peptidsynthese zur Bildung eines linearen Peptidamids;
- (iii) Abspalten des linearen Peptidamids von dem festen Träger, um ein lineares Peptidamid der Sequenz  $\text{Mpr-S-S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH}_2$ ,  $\text{HS-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH}_2$  oder  $[\text{S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH}_2]_2$  zu erhalten; und
- (iv) Cyclisieren des Peptidamids, um  $c[\text{Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys}]\text{-NH}_2$ , cyclisiert durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys und Mpr, zu bilden.

**[0010]** Eine stärker bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sieht ein Verfahren für die Festphasen-Syn-

these von c[Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys]-NH<sub>2</sub>, cyclisiert durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys und Mpr, vor, welches Folgendes umfasst:

- (i) Anheften der Thiol-Seitenkette von Fmoc-Cys-NH<sub>2</sub> an einen geeigneten reaktiven festen Träger;
- (ii) Durchführen einer Festphasen-Peptidsynthese ohne die Verwendung einer Schutzgruppe auf der Seitenkette von Homoarginin zur Bildung eines linearen Peptids;
- (iii) Abspalten des linearen Peptidamids von dem festen Träger, um ein lineares Peptidamid der Sequenz HS-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub> zu erhalten; und
- (iv) Cyclisieren des Peptidamids, um c[Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys]-NH<sub>2</sub>, cyclisiert durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys und Mpr, zu bilden.

**[0011]** N $\alpha$ -Fmoc-C $\alpha$ -Carboxamidaminosäuren können durch Umsetzen der Seitenkette einer Aminosäure mit einer Schutzgruppe und anschließendes Amidieren des C $\alpha$ -Carboxyls hergestellt werden. Die Amidierung wird bevorzugt durch Umwandeln der Aminosäure- $\alpha$ -Carboxylgruppe zu einem aktiven Ester, gefolgt von einer Umsetzung mit einem Amidierungsmittel, wie Ammoniumbromid/N-Methylmorpholin, durchgeführt. Wenn eine Seitenketten-Schutzgruppe verwendet wird, umfasst sie vorzugsweise eine Trityleinheit. Nach der Amidierung kann die Trityl-Schutzgruppe leicht unter Anwendung bekannter Bedingungen, wie durch Behandeln beispielsweise mit Trifluoressigsäure und Triisopropylsilan, in einem geeigneten Lösungsmittel, wie Dichlormethan, entfernt werden.

**[0012]** Der feste Träger in Schritt (i) kann jeder im Fachbereich bekannte Träger sein, welcher für die Verwendung in der Festphasen-Peptidsynthese geeignet ist. Solche Träger können üblicherweise über eine Bindungsgruppe mit einer Seitenkette einer Aminosäure, stärker bevorzugt einer nukleophilen Aminosäure-Seitenkette reagieren, um eine Bindung zu bilden, die während der Peptid-Synthese von Schritt (ii) stabil ist, aber dennoch die Freisetzung des Peptidamids in Schritt (iii) zulässt.

**[0013]** Vorzugsweise basiert der feste Träger auf einem Polystyrol- oder Polydimethylacrylamidpolymer. Stärker bevorzugt ist der Träger ein Copolymer von Styrol mit etwa 0,5 bis 2 % Divinylbenzol als Vernetzungsmittel oder ein Polydimethylacrylamidpolymer, welches N,N-Dimethylacrylamid, N,N-Bisacryloylethylendiamin und Acryloylsarcosinmethylestermonomere umfasst. Details dieser bevorzugten Träger und anderer geeigneter Träger sind bei Chan und White "Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis" (Fmoc-Festphasen-Peptidsynthese), Oxford University Press, 2000, zu finden, was hierin durch Bezugnahme eingeschlossen ist.

**[0014]** Die bevorzugte Linkergruppe umfasst eine Trityleinheit, stärker bevorzugt eine 4-Methoxytrityleinheit.

**[0015]** Auf Basis der oben genannten Präferenzen ist ein besonders bevorzugter fester Träger 4-Methoxytritylpolystyrol.

**[0016]** Der Schritt (i) kann unter den gleichen Bedingungen und in den gleichen Lösungsmitteln durchgeführt werden, wie sie üblicherweise beim Binden von Aminosäuren mittels deren C $\alpha$ -Carboxyl an feste Träger in der Peptid-Festphasensynthese verwendet werden. Diese Verfahren sind im Fachbereich allgemein bekannt und sind in zahlreichen Standardtexten zu dem Thema, wie bei Atherton und Sheppard, "Solid-Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach" (Festphasen-Peptidsynthese – eine praktische Vorgehensweise), IRL Press at Oxford University Press, 1989, und Chan und White "Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis" (Fmoc Festphasen-Peptidsynthese), Oxford University Press, 2000, die hierin durch Bezugnahme eingeschlossen sind, beschrieben.

**[0017]** Wenn das Harz 4-Methoxytritylpolystyrol ist, umfasst der Schritt (i) typischerweise das Auflösen der N $\alpha$ -Fmoc-C $\alpha$ -carboxamid-aminosäure in einem geeigneten Lösungsmittel, wie N,N-Dimethylformamid und anschließend das Hinzufügen unter Mischen von N,N-Diisopropylethylamin. Diese N $\alpha$ -Fmoc-C $\alpha$ -carboxamidaminosäurelösung wird dann dem Harz zugegeben und reagieren gelassen, bevor das Harz gesammelt und mit einem geeigneten Lösungsmittel, wie N,N-Dimethylformamid, gewaschen wird.

**[0018]** Die Kopplungs- und Entschützungszyklen der Peptid-Synthese können unter Anwendung von Standardbedingungen für die im Fachbereich allgemein bekannte Peptid-Festphasensynthese durchgeführt werden. Zu weiteren Einzelheiten wird beispielsweise auf Atherton und Sheppard, "Solid-Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, 1989, und Chan und White "Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis" Oxford University Press, 2000, die hierin durch Bezugnahme eingeschlossen sind, verwiesen. Es ist besonders bevorzugt, dass die Fmoc-Entfernung durch Behandeln mit einer Lösung von Piperidin in N,N-Dimethylformamid, stärker bevorzugt von 20 % v/v Piperidin in N,N-Dimethylformamid, bewirkt wird.

**[0019]** Die Aminosäure-Aktivierung wird vorzugsweise in N,N-Dimethylformamid in Gegenwart von 1-Hydroxybenzotriazol (BtOH) und Diisopropylcarbodiimid durchgeführt.

**[0020]** Bei der Peptid-Synthese können Seitenketten-Schutzgruppen zum Schützen von empfindlichen Seitenketten verwendet werden, die ansonsten in den Kopplungs- und Entschützungszyklen modifiziert werden könnten. Beispiele für Aminosäuren mit empfindlichen Seitenketten sind Cys, Asp, Glu, Ser, Arg, Har, Tyr, Thr, Lys, Orn, Pen, Trp, Asn und Gln. Alternativ kann eine chemische Modifikation des Peptidamids in einer Nach-Festphasen-Synthese durchgeführt werden, um eine gewünschte Seitenkette zu erhalten. Zum Beispiel kann entsprechend dem Verfahren der US 5 318 899 Homoarginin durch Guanidierung eines Lysin-Restes hergestellt werden.

**[0021]** Es wurde festgestellt, dass in bestimmten Ausführungsformen eines Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung einige Seitenketten-Schutzgruppen weggelassen werden können. Somit werden in einem bevorzugten Verfahren der vorliegenden Erfindung Fmoc-Arg und Fmoc-Har ohne die Verwendung einer Seitenketten-Schutzgruppe gekoppelt. Dies kann erreicht werden, indem sichergestellt wird, dass nach dem Koppeln von Arg oder Har die Guanidin-Gruppe auf der Seitenkette dieser Aminosäurereste vor irgendwelchen weiteren Kopplungsreaktionen protoniert wird. Dies wird vorzugsweise durch Behandeln des harzgebundenen Peptidamids mit einem Überschuss an BtOH erreicht.

**[0022]** Die genauen Bedingungen, die zum Abspalten des Peptidamids von dem festen Träger erforderlich sind, variieren mit der Natur der Linkergruppe auf dem Träger und sind im Fachbereich bekannt. Typischerweise kann mit 4-Methoxytritylpolystyrol das Peptidamid durch Behandeln des Peptidamidharzes mit 10 % (v/v) Ethandithiol in Trifluoressigsäure freigesetzt werden.

**[0023]** Im Schritt (iii) können jegliche Seitenketten-Schutzgruppen entfernt werden, entweder bevor oder nachdem die Bindung zwischen dem festen Träger gespalten wurde. Allerdings ist es bevorzugt, dass die Spaltung der Bindung zwischen dem festen Träger und dem Peptidamid und die Entfernung jeglicher Seitenketten-Schutzgruppen in einem einzigen Verfahren erfolgt. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die  $\alpha$ -Stickstoff-Schutzgruppe von dem N-Terminus entfernt wird, die Bindung zwischen dem festen Träger und Peptidamid gespalten wird, und die Entfernung jeglicher Seitenketten-Schutzgruppen in einem einzigen Verfahren durchgeführt wird.

**[0024]** Die Isolierung und Reinigung des Peptidamids kann mit Hilfe von Standardverfahrensweisen und -techniken erreicht werden, die einem Fachmann auf dem Gebiet wohlbekannt sein sollten. Diese Verfahren schließen die Ausfällung des Peptidamids in einem Lösungsmittel ein, welches die Integrität des Peptidamids, nicht beeinträchtigt, wie Diisopropylether, gefolgt von einer präparativen HPLC, Ionenaustauschchromatographie und einem Salzaustausch.

**[0025]** Das isolierte Peptidamid kann einer weiteren Verarbeitung unterzogen werden, entweder vor oder nach der Reinigung. Vorzugsweise wird das Peptidamid im Anschluss an die Isolierung und gegebenenfalls Reinigung cyclisiert. Stärker bevorzugt wird das Peptidamid durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Resten in dem Peptidamid, die verfügbare Thiole tragen, cyclisiert.

**[0026]** Es kann jedes geeignete Verfahren zur Cyclisierung des Peptidamids mittels einer Disulfidbrücke angewandt werden. Beispiele für im Fachbereich bekannte Verfahren sind von Albericio et al., bei Chan und White "Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis", Oxford University Press, 2000, Seiten 91 bis 114, zusammengefasst, welche Verfahren durch Bezugnahme hierin mit eingeschlossen sind. Beispiele solcher Verfahren schließen ein: Luftoxidation; Oxidation in Gegenwart von Redoxpuffern, wie Tris-Puffer, welcher EDTA und oxidiertes und reduziertes Glutathion umfasst; Dimethylsulfoxid (DMSO)-vermittelte Oxidation; Kaliumferricyanid-vermittelte Oxidation; Ellman-Reagens, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)-vermittelte Oxidation; Iod-vermittelte Oxidation; Thallium(III)-trifluoressigsäure-vermittelte Oxidation; Alkyltrichlorsilansulfoxid-vermittelte Oxidation; Silber-Trifluormethansulfonat-DMSO-wässrige HCl-vermittelte Oxidation; und gerichtete Disulfidbildung unter Verwendung von Mitteln, wie 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin), 2,2'-Dithiopyridin und Bis(tert-butyl)azocarboxylat.

**[0027]** Vorzugsweise wird die Cyclisierung durch Verdünnen des Peptidamids, das zwei Reste mit verfügbaren Thiolen enthält, in einem wässrigen Medium auf eine Konzentration zum Beispiel von weniger als 1 g pro Liter, was die Bildung einer internen Disulfidbindung ermöglicht, und anschließendes Einstellen des pH-Wertes auf einen alkalischen pH-Wert, wie einen pH-Wert von 7,5 bis 10,5, vorzugsweise einen pH-Wert von 8 bis 10, stärker bevorzugt einen pH-Wert von 8,5 bis 9,5 und insbesondere von etwa 9, bewirkt. Es wird anerkannt, dass die optimale Peptid-Konzentration und der pH-Wert von einer Reihe von Faktoren, wie der Natur sowohl

des Thiols als auch des Peptids, abhängen.

**[0028]** Die Cyclisierung kann auch entweder erreicht werden durch:

- (a) Synthesieren eines Analogs des gewünschten Peptidamids mit einer zusätzlichen Thiol-haltigen Verbindung, die durch eine Disulfidbrücke mit einem Thiol-haltigen Rest, vorzugsweise dem N-terminalen Rest, innerhalb des Peptidamids gebunden ist. Diese zusätzliche Thiol-haltige Verbindung ist vorzugsweise die gleiche wie der Rest, an welchen sie gebunden ist, und ist vorzugsweise Zystein, Penicillamin oder stärker bevorzugt Mercaptopropionsäure. Dieses Disulfid-haltige Peptidamid-Analog ist zu einer internen Neuordnung unter Umsetzung mit einem Thiol auf einem weiteren Rest in dem Peptidamid fähig, um ein cyclisches Peptidamid zu ergeben; oder
- (b) Synthetisieren eines Dimers des gewünschten Peptidamids, bei dem die einzelnen Ketten durch eine oder mehrere Disulfidbrücken verknüpft sind. Diese Dimere können dann unter geeigneten Bedingungen eine interne Neuordnung eingehen, um entweder ein einzelnes Äquivalent oder zwei Äquivalente des gewünschten cyclischen Peptids zu ergeben.

**[0029]** Die interne Neuordnung in (a) und (b) beinhaltet üblicherweise das Verdünnen des Peptids in einem wässrigen Medium auf eine Konzentration von zum Beispiel 5 bis 20 g pro Liter, was die Bildung einer internen Disulfidbindung erlaubt, und das anschließende Einstellen des pH-Wertes auf einen alkalischen pH-Wert, wie einen pH-Wert von 7,5 bis 10,5, vorzugsweise einen pH-Wert von 8 bis 10, stärker bevorzugt einen pH-Wert von 8,5 bis 9,5, und insbesondere einen pH-Wert von ungefähr 9. Es wird anerkannt, dass die optimale Peptidkonzentration und der optimale pH-Wert von einer Reihe von Faktoren, wie der Natur sowohl des Thiols als auch des Peptids, abhängen.

**[0030]** Vorzugsweise umfasst das durch das Verfahren hergestellte Peptidamid eine Har-G-D-Gruppierung. Stärker bevorzugt ist das durch das Verfahren hergestellte Peptidamid zur Bildung einer Disulfid-verbrückten cyclischen Verbindung imstande. Es ist besonders bevorzugt, dass das durch dieses Verfahren hergestellte Peptidamid gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

HS-Mpr-A-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-P-Har-G-O-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-G-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-Aib-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-(N-Me-Arg)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-(N-Me-Ser)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-(D-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-(B-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-(N-Me-Leu)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-(N-Me-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-Sar-Nar-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-V-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-Har-G-D-W-P-A-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-Har-G-D-W-P-(N-Me-Ala)-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-Har-G-D-W-P-(D-Ala)-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-Nar-G-D-W-P-P-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-Har-G-D-W-P-Sar-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-Har-G-D-W-P-Aib-C-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-A-Har-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-A-K-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>  
 HS-Mpr-D-Har-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>

**[0031]** Verfahren zur Herstellung von Peptidamiden, welche Dimere von irgendwelchen der oben genannten Verbindungen umfassen, die durch eine Disulfidbrücke verknüpft sind, oder mit einer zusätzlichen Thiolverbindung, die durch eine Disulfidbrücke an ein Thiol in dem Peptidamid verknüpft ist, sind ebenfalls bevorzugt.

**[0032]** Es ist besonders bevorzugt, dass das durch das Verfahren hergestellte Peptidamid die folgenden Sequenzen umfasst:

HS-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub>;  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub>; oder  
 -[S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>.

**[0033]** Insbesondere ist es bevorzugt, dass das durch das Verfahren hergestellte Peptidamid die Sequenz HS-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub> umfasst.

**[0034]** Vorzugsweise werden diese linearen Peptidamide dann cyclisiert, wodurch c[Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys]-NH<sub>2</sub> mittels einer Disulfidbrücke zwischen Cys und Mpr erhalten wird.

**[0035]** Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung stellt bereit:

Die Verfahren der vorliegenden Erfindung können Ansatz-Synthesetechniken oder Synthesetechniken im kontinuierlichen Durchfluss oder jegliche automatisierten Synthesizer gemäß den Vorschriften des Herstellers anwenden.

**[0036]** Ein zweiter Aspekt der Erfindung stellt ein Disulfid-Dimer eines Peptidamids bereit, welches eine Har-G-D-Gruppierung umfasst. Es ist bevorzugt, dass Verbindungen gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung gewählt werden aus der Gruppe bestehend aus:

-[S-Mpr-A-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-P-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-G-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-Aib-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -(S-Mpr-(N-Me-Arg)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-(N-Me-Ser)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-(D-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-(B-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-(N-Me-Leu)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-(N-Me-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -(S-Mpr-Sar-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-V-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-Har-G-D-W-P-A-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -(S-Mpr-Har-G-D-W-P-(N-Me-Ala)-C-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-Har-G-D-W-P-(D-Ala)-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -(S-Mpr-Har-G-D-W-P-P-C-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-Har-G-D-W-P-Sar-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-Har-G-D-W-P-Aib-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-A-Har-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-A-K-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-D-Har-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>.

**[0037]** Eine besonders bevorzugte Verbindung gemäß dem zweiten Aspekt der Erfindung besitzt die Sequenz:

-[S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>.

**[0038]** Ein dritter Aspekt der Erfindung stellt ein Peptidamid bereit, welches eine Har-G-D-Gruppierung umfasst, welche eine zusätzliche Thiol-haltige Verbindung umfasst, die durch eine Disulfidbindung an ein Thiol in dem Peptidamid gebunden ist. Es ist bevorzugt, dass die zusätzliche Thiol-haltige Verbindung durch eine Disulfidbindung an einen N-terminalen Thiol-haltigen Rest in dem Peptid gebunden ist. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die zusätzliche Thiol-haltige Verbindung die gleiche ist wie der Peptidrest, an welchen diese durch eine Disulfidbindung gebunden ist. Es ist besonders bevorzugt, dass die zusätzliche Thiolhaltige Verbindung Mercaptopropionsäure ist und dass sie an eine N-terminale Mercaptopropionsäure in einem Peptidamid gebunden ist.

**[0039]** Es ist bevorzugt, dass Verbindungen gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung aus der Gruppe gewählt werden, die aus Folgendem besteht:

Mpr-S-S-Mpr-A-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-P-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-G-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Aib-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(N-Me-Arg)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(N-Me-Ser)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(D-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(B-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>

Mpr-S-S-Mpr-(N-Me-Leu)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(N-Me-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Sar-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-V-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-A-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-(N-Me-Ala)-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-(D-Ala)-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-Sar-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-Aib-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-A-Har-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-A-K-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-D-Har-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>.

**[0040]** Eine besonders bevorzugte Verbindung gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung besitzt die Sequenz:  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub>

**[0041]** Die Erfindung wird nun erläutert, aber nicht eingeschränkt, durch die folgenden Beispiele.

#### Beispiel 1

Synthese von Eptifibatid c[Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys]-NH<sub>2</sub>

#### Abkürzungen

DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
EDT	1,2-Ethandithiol
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Har	Homoarginin
BtOH	1-Hydroxybenzotriazol
IPP	Diisopropylether
Mpr	3-Mercaptopropionsäure
[Mpr-OH] <sub>2</sub>	3-Mercaptopropionsäuredisulfid
NMM	N-Methylmorpholin
TIPS	Triisopropylsilan
TFA	Trifluoressigsäure

#### Schritt 1 Fmoc-Cys-NH<sub>2</sub>-Synthese

##### Schritt 1(a) Amidierung von Fmoc-Cys(Trt)-OH

**[0042]** Fmoc-Cys(Trt)-OH (584,0 g) und BtOH.H<sub>2</sub>O (306,0 g) wurden getrennt in einen Duran-Kolben gefüllt und in DMF (6 Liter) gelöst. Der Kolben wurde dann in ein Eisbad eingetaucht.

**[0043]** Nachdem die Lösung <5°C erreicht hatte, wurde ein einzelnes Aliquot von DIC (155,8 ml) zugegeben, und die Reaktionsmischung wurde 18 Minuten lang zur Bildung des aktiven Esters gerührt. Der Kolben wurde dann aus dem Eisbad entnommen, getrocknet und sich auf Raumtemperatur erwärmen gelassen.

**[0044]** NH<sub>4</sub>Br (107,7 g) wurde in einen trockenen Duran-Kolben gewogen, und DMF (800 ml) wurde unter Rühren bis zur Klärung zugegeben. Ein Aliquot von NMM (120,8 ml) wurde dann unter Mischen der Lösung von NH<sub>4</sub>Br zugegeben, die dann in die Lösung der aktivierten Fmoc-Aminosäure gefüllt wurde. Im Verlauf der ersten Minute des Mischens gab es eine deutliche Farbveränderung von blassgelb zu hellgelb. Die Reaktionsmischung wurde dann bei Raumtemperatur 4,5 bis 18 Stunden gerührt.

**[0045]** Die Reaktionsmischung wurde in einen 5-Liter-Rundkolben umgefüllt und portionsweise auf ungefähr ein Drittel des ursprünglichen Volumens (2,3 Liter) eingedampft. Die blass-orangene Flüssigkeit wurde in einen

5-Liter-Reaktionskolben umgefüllt und kräftig mit einem Überkopf-Rührer gerührt. Nicht umgesetztes saures BtOH wurde durch die vorsichtige Zugabe von 5 % w/v  $\text{NaHCO}_3$  (wässrig) (2,0 Liter) neutralisiert, und die sich daraus ergebenden Medien wurden mit  $\text{H}_2\text{O}$  (4,0 Liter) verdünnt. Während dieser Stufe wurde das zwischenstufige Fmoc-Cys(Trityl)- $\text{NH}_2$  als teigartige weiße Festsubstanz ausgefällt. Dieser Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen ( $3 \times 4$  Liter) und 0,5 Stunden luftgetrocknet, bevor er in einen Exsikkator umgefüllt wurde und "in vacuo" (im Vakuum) 18 Stunden lang getrocknet wurde.

#### Schritt 1(b) Entfernung der Trityl-Schutzgruppe

**[0046]** Das Produkt von Schritt 1(a), Fmoc-Cys(Trt)- $\text{NH}_2$  (585,0 g) wurde in einen 10-Liter-Reaktorbehälter umgefüllt und in DCM (600 ml) über einen Zeitraum von 0,3 Stunden unter Verwendung eines Überkopf-Rührers gelöst. Ein Aliquot von TIPS (200 ml) wurde der Reaktionsmischung zugegeben, welche dann in ein Eisbad vor der Zugabe von TFA (5,1 Liter) eingetaucht wurde. Die Reaktionsmischung wurde 10 Minuten lang bei der verringerten Temperatur leicht gerührt und dann zur Raumtemperatur zurückkehren gelassen und für weitere 1,5 Stunden gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Eindampfen konzentriert, wodurch eine ölige Festsubstanz erhalten wurde. Dieses Produkt wurde in DCM (1,0 Liter) rekonstituiert und noch einmal eingedampft, um die TFA aus dem Produkt azeotrop zu entfernen. Dies führte zu einer weißen Festsubstanz, die in Ethylacetat (3,0 Liter) unter kräftigem Rühren extrahiert wurde, wodurch eine blassgelbe Lösung erhalten wurde. Diese Lösung wurde zu Petroleumether 60/80 (19,0 Liter) unter kräftigem Rühren zugegeben, um Fmoc-Cys- $\text{NH}_2$  auszufällen. Das Rühren wurde 30 Minuten lang fortgesetzt, um eine homogene Festsubstanz vorzusehen. Diese wurde filtriert und 3 Mal mit Petroleumether 60/80 (1,0 Liter pro Waschung) gewaschen. Die resultierende Festsubstanz wurde dann 'in vacuo' während 18 Stunden entfachtet. Die Ausfällung durch Petroleumether wurde 3 Mal wiederholt, um jegliches Trityl-TIPS-Addukt aus dem Produkt zu entfernen.

#### Schritt 2 Fmoc-Cys- $\text{NH}_2$ -Anheftung

**[0047]** Fmoc-Cys- $\text{NH}_2$  (745,1 g) von Schritt 1 wurde in DMF (2615 ml) unter Rühren gelöst. DIPEA (506 g) wurde dann der resultierenden Aminosäurelösung zugegeben, und es wurde während 1 Minute vermischt. Diese Fmoc-Cys- $\text{NH}_2$ -Lösung wurde zu 4-Methoxytritylpolystyrolharz (747 g) (von CBL-Patros, Griechenland) zugegeben, und die Mischung wurde zwei Stunden lang vermischt und danach in einen Reaktorbehälter gefüllt, was die Entfernung des Lösungsmittels durch Filtration ermöglichte. Das Harz mit angeheftetem Fmoc-Cys- $\text{NH}_2$  wurde dann sieben Mal mit 9 l DMF gewaschen. Das gewaschene Harz wurde dann in 10 v/v DIPEA in Methanol (6, 7 l) 5 Minuten lang vor der Filtration und dem anschließenden 7-maligen Waschen mit 9 l DMF suspendiert.

#### Schritt 3 Fmoc-Gruppen-Entfernung

**[0048]** Die Fmoc-Schutzgruppe wurde durch 2-maliges Behandeln des Harzes von Schritt 2 mit 20 % Piperidin in DMF ( $2 \times 9$  L) entfernt. Bei der ersten Behandlung wurden das Harz und die Piperidin/DMF-Mischung leicht 3 Minuten lang gerührt, bevor das Piperidin/DMF durch Filtration entfernt wurde. Bei der zweiten Behandlung wurden das Harz und die Piperidin/DMF-Mischung leicht 7 Minuten lang gerührt, bevor das Piperidin/DMF durch Filtration entfernt wurde. Das Harz wurde dann 7 Mal mit DMF ( $7 \times 9$  L) gewaschen, wobei das Lösungsmittel durch Filtration entfernt wurde.

#### Schritt 4 Aminosäure-Aktivierung und -Zugabe

**[0049]** Fmoc-Pro-OH (661 g) und BtOH. $\text{H}_2\text{O}$  (600 g) wurden in DMF (1949 ml) gelöst und auf weniger als  $10^\circ\text{C}$  in einem Eisbad abgekühlt. DIC wurde der Reaktionsmischung in 10 Aliquoten von 41 ml über einen Zeitraum von 10 Minuten unter Rühren zugegeben. Die Temperatur der Reaktionsmischung wurde während der Zugabe von DIC überwacht und unter  $20^\circ\text{C}$  gehalten. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 6 Minuten gerührt und danach dem entschützten gewaschenen Harz von Schritt 3 zugegeben. Die Kopplungsreaktion wurde 6 Stunden lang bei Umgebungstemperatur ablaufen gelassen. Die Kopplungseffizienz wurde durch den Kaiser-Test untersucht. Das Peptidamidharz wurde dann mit DMF (9 l) gewaschen, und die schützende Fmoc-Gruppe wurde wie in Schritt 3 entfernt.

**[0050]** Das oben beschriebene Verfahren wurde dann wiederholt unter Koppelung von Fmoc-Trp-OH (835 g) an das harzgebundene Prolin, mit der Ausnahme, dass der Chloranil-Test für sekundäre Amine an Stelle des Kaiser-Tests angewandt wurde.

**[0051]** Fmoc-Asp(OtBu)-OH (806 g) und Fmoc-Gly-OH (582 g) wurden mit Hilfe des oben genannten Proto-



kolls für Fmoc-Pro-OH gekoppelt.

**[0052]** Fmoc-Har-OH (894 g) wurde unter Verwendung des gleichen Protokolls wie Fmoc-Pro-OH gekoppelt, mit der Ausnahme, dass 900 g BtOH.H<sub>2</sub>O verwendet wurden. Nach der Har-Kopplung und im Anschluss an die Fmoc-Gruppen-Entfernung und DMF-Waschungen (das Volumen jeder Waschung wurde auf 11,25 l erhöht) wurde eine Lösung von BtOH.H<sub>2</sub>O (1125 g) in DMF (11,25 L) dem Harz zugegeben, welches 5 Minuten lang gerührt und danach filtriert wurde.

**[0053]** [Mpr-OH]<sub>2</sub> (412 g) wurde mit Hilfe des gleichen Protokolls wie für Fmoc-Pro-OH gekoppelt, mit der Ausnahme, dass das Volumen von DMF, das in den Waschungen verwendet wurde, von 9 l auf 11,25 l erhöht wurde.

**[0054]** Das Harz wurde vor der Abspaltung mit DCM (5 × 7, 50 l) zusammenfallen gelassen. Das Harz wurde dann 1 Stunde lang luftgetrocknet.

#### Schritt 5 Peptidamid-Abspaltung und Seitenketten-Schutzgruppen-Entfernung

**[0055]** 10 % (v/v) EDT/TFA (15 Liter) wurde mit dem Peptidamidharz aus Schritt 4 vermischt. Ein weiteres Aliquot von TFA (15 Liter) wurde zugegeben unter Fortsetzung des Rührens. Dreißig Minuten nach der Anfangsbeladung wurde die rohe Lösung des linearen Peptidamids von dem Harz filtriert. Das Harz wurde 3 Mal mit TFA (3 × 15 Liter) gewaschen. Die kombinierten Filtrate wurden vereinigt und zu einem Öl durch Rotationsverdampfung konzentriert (Badtemperatur <35°C). Die Verdampfung wurde unterbrochen, als es zu einem plötzlichen Abfall der Verdampfungsrate kam. Das resultierende Öl wurde allmählich zu gerührtem IPP (100 Liter) zugegeben. Der Verdampfungskolben wurde mit TFA (2 × 250 ml) gespült, und diese Spülungen wurden ebenfalls dem IPP unter Fortsetzung des Rührens zugegeben. Die Mischung wurde weitere 10 Minuten lang gerührt, und das sich ergebende ausgefällte Peptidamid wurde unter Schwerkraft während mindestens 30 Minuten sich absetzen gelassen. Die Festsubstanz wurde abgefiltert und 3 Mal mit IPP (3 × 20 Liter) gewaschen, wobei darauf geachtet wurde, dass nicht zu große Mengen Luft durch das Material gezogen wurden. Das rohe lineare Peptidamid wurde dann über Nacht "in vacuo" bei 20°C auf ein konstantes Gewicht getrocknet.

#### Schritt 6 Peptidamid-Cyclisierung

**[0056]** Das Peptidamid von Schritt 5 (200 g) wurde in Acetonitril (1150 ml) suspendiert, und es wurde Wasser (1150 ml) unter Mischen zugegeben, um eine Lösung vorzusehen. Diese Lösung wurde dann in Wasser (20,7 Liter) unter Rühren gegeben. Eine Lösung von Ammoniak in Wasser (3,5 w/v) wurde der Peptidamidlösung zugegeben, um den pH-Wert auf 9,0 ± 0,25 einzustellen. Die Menge an Ammoniak, die erforderlich war, betrug ungefähr 2,0 ml/g rohes Peptidamid. Falls der pH-Wert 9,25 überschritt, wurde Essigsäure zugegeben, um den pH-Wert in den erforderlichen Bereich zu bringen. Die resultierende Lösung wurde gerührt, bis die Cyclisierung vollendet war, und das Ganze wurde durch HPLC nach vier Stunden, danach in stündlichen Intervallen kontrolliert. Der Endpunkt der Reaktion galt dann als erreicht, als die Menge von vollständig reduziertem linearem Peptidamid auf unter 2,5 % abfiel, wie durch eine analytische HPLC bewertet.

**[0057]** Das HPLC-Analyseverfahren, das zur Überwachung der Cyclisierung angewandt wurde, war wie folgt:

Puffer A	6 mM HCl/Wasser
Puffer B	Acetonitril
Säule	Waters SymmetryShield RP <sub>8</sub> 3,5 µm 100 Å 150 × 4,6 mm
Gradient	10 bis 35% Puffer B in Puffer A über 30 Minuten
Fließrate	1 cm <sup>3</sup> /min
Wellenlänge	204 nm
Injektionsvolumen	10 µl
Temperatur	30°C
Peakbreite	1,0
Peakempfindlichkeit	0,4

## Schritt 7 Reinigung

## Schritt 7(a) Präparative HPLC

**[0058]** Die cyclisierte Peptidamidlösung von Schritt 6 wurde mit 10 % Citronensäure in Wasser (34 ml/g rohes Peptidamid) angesäuert und bis zur Auflösung gerührt.

**[0059]** Die resultierende Lösung wurde durch einen 0,45-µm-Filter filtriert und durch präparative HPLC auf Kromasil C8 (von Eka Nobel) gereinigt. Die Bedingungen waren wie folgt:

Medien	Kromasil C8 (10 µ, 100 Å, 3 kg)
Säulenabmessungen	25 × 15 cm Innendurchmesser
Fließrate	375 ml/min
Detektion	254 nm
Puffer A	10 mM HCl/Wasser
Puffer B	Acetonitril
Gradient	5 % Puffer B in Puffer A für 10 Minuten 5-30 % Puffer B in Puffer A über 75 Minuten 30-75 % Puffer B in Puffer A über 5 Minuten

**[0060]** Die Peak-Fractionen wurden gesammelt, miteinander vereint und bei 4°C gelagert und durch Salzaustausch, Entsalzen, Eindampfen und Lyophilisierung weiter gereinigt, wodurch das reine cyclische Peptidamid erhalten wurde.

## Beispiel 2

## Schritt 1

**[0061]** Der Schritt 1 wurde wie in Beispiel 1, Schritt 1, durchgeführt.

Schritt 2 Fmoc-Cys-NH<sub>2</sub>-Anheftung

**[0062]** Fmoc-Cys-NH<sub>2</sub> (418,5 g) von Schritt 1 wurde in DMF (2692 ml) unter Rühren gelöst. Dieses wurde dann in einen Rotationsverdampfer umgefüllt, und 25-50 % des DMF wurden durch Verdampfen entfernt (Badtemperatur <35°C). Die restliche Lösung wurde durch die Zugabe von weiterem DMF auf 3766 ml gebracht. DIPEA (381 g) wurde dann der resultierenden Aminosäurelösung zugegeben, und es wurde 1 Minute lang vermischt. Diese Fmoc-Cys-NH<sub>2</sub>-Lösung wurde zu 4-Methoxytritylpolystyrolharz (769 g) (von CBL-Patros, Griechenland) zugegeben, und die Mischung wurde zwei Stunden lang gemischt, danach in einen Reaktorbehälter gefüllt, was die Entfernung des Lösungsmittels durch Filtration erlaubte. Das Harz mit daran angeheftetem Fmoc-Cys-NH<sub>2</sub> wurde dann 7 Mal mit 9,23 l DMF gewaschen. Das gewaschene Harz wurde dann in 10 % v/v DIPEA in Methanol (9,23 l) 5 Minuten lang vor der Filtration und dem nachfolgenden 7-maligen Waschen mit 9,23 l DMF suspendiert.

## Schritt 3 Fmoc-Gruppen-Entfernung

**[0063]** Die Fmoc-Schutzgruppe wurde durch zweimaliges Behandeln des Harzes von Schritt 2 mit 20 % Piperidin in DMF (2 × 9,23 l) entfernt. Bei der ersten Behandlung wurden das Harz und die Piperidin/DMF-Mischung leicht 3 Minuten lang gerührt vor der Entfernung des Piperidin/DMF durch Filtration. Bei der zweiten Behandlung wurden das Harz und die Piperidin/DMF-Mischung leicht 7 Minuten lang gerührt vor der Entfernung des Piperidin/DMF durch Filtration. Das Harz wurde dann 7 Mal mit DMF (7 × 9,23 l) unter Entfernung des Lösungsmittels durch Filtration gewaschen.

## Schritt 4 Aminosäure-Aktivierung und -Zugabe

**[0064]** Fmoc-Pro-OH (506 g) und BtOH.H<sub>2</sub>O (405,3 g) wurden in DMF (2007 ml) gelöst und auf weniger als 5°C in einem Eisbad gekühlt. DIC wurde der Reaktionsmischung in 10 Aliquoten von 31 ml über einen Zeitraum von 10 Minuten unter Rühren zugegeben. Die Temperatur der Reaktionsmischung wurde während der Zugabe von DIC überwacht und unter 30°C gehalten. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 6 Minuten gerührt und danach dem entschützten gewaschenen Harz von Schritt 3 zugegeben. Die Kopplungsreaktion wurde 6 Stunden lang bei Umgebungstemperatur ablaufen gelassen. Die Kopplungseffizienz wurde durch den Kaiser-Test

untersucht. Das Peptidamidharz wurde dann mit DMF (9,23 l) gewaschen und die schützende Fmoc-Gruppe wurde wie in Schritt 3 entfernt.

**[0065]** Das oben beschriebene Verfahren wurde danach unter Kopplung von Fmoc-Trp-OH (639,7 g) an das harzgebundene Prolin wiederholt, mit der Ausnahme, dass der Chloranil-Test für sekundäre Amine an Stelle des Kaiser-Tests angewandt wurde.

**[0066]** Fmoc-Asp(OtBu)-OH (617,1 g) und Fmoc-Gly-OH (445,9 g) wurden mit Hilfe des oben genannten Protokolls für Fmoc-Pro-OH gekoppelt.

**[0067]** Fmoc-Har-HCl.OH (744,9 g) wurden mit Hilfe des gleichen Protokolls wie Fmoc-Pro-OH gekoppelt. Nach der Har-Kopplung und im Anschluss an die Fmoc-Gruppen-Entfernung und DMF-Waschungen (das Volumen jeder Waschung wurde auf 11,53 l erhöht) wurde eine Lösung von BtOH.H<sub>2</sub>O (1154 g) in DMF (10,35 l) dem Harz zugegeben, welches 5 Minuten gerührt und dann filtriert wurde.

**[0068]** Trt-Mpr-OH (522,7 g) wurde mit Hilfe des gleichen Protokolls wie für Fmoc-Pro-OH gekoppelt, mit der Ausnahme, dass das in den Waschungen verwendete Volumen von DMF von 9,23 l auf 11,50 l erhöht wurde.

**[0069]** Das Harz wurde vor der Abspaltung mit DCM (5 × 7,69 l) zum Zusammenfallen gebracht. Das Harz wurde dann 1 Stunde lang luftgetrocknet.

#### Schritt 5 Peptidamid-Abspaltung und Seitenketten-Schutzgruppen-Entfernung

**[0070]** 10 % (v/v) EDT/TFA (15 Liter) wurde mit dem Peptidamidharz aus Schritt 4 vermischt. Ein weiteres Aliquot von TFA (15 Liter) wurde zugegeben unter Fortsetzung des Rührens. Dreißig Minuten nach der Anfangsbeladung wurde die rohe Lösung des linearen Peptidamids von dem Harz filtriert. Das Harz wurde 3 Mal mit TFA (3 × 5 Liter) gewaschen. Die kombinierten Filtrate wurden vereinigt und durch Rotationsverdampfung konzentriert (Badtemperatur <35°C). Die Verdampfung wurde unterbrochen, als 5 Liter übrig blieben. Die resultierende Lösung wurde allmählich zu gerührtem IPP (100 Liter) zugegeben. Der Verdampfungskolben wurde mit TFA (2 × 250 ml) gespült, und diese Spülungen wurden ebenfalls dem IPP unter Fortsetzung des Rührens zugegeben. Die Mischung wurde weitere 10 Minuten lang gerührt, und das sich ergebende ausgefällte Peptidamid wurde unter Schwerkraft während mindestens 30 Minuten sich absetzen gelassen. Die Festsubstanz wurde abfiltriert und 3 Mal mit IPP (3 × 20 Liter) gewaschen, wobei darauf geachtet wurde, dass nicht zu große Mengen Luft durch das Material gezogen wurden. Das rohe lineare Peptidamid wurde dann über Nacht "in vacuo" bei 20-25°C auf ein konstantes Gewicht getrocknet.

#### Schritt 6 Peptidamid-Cyclisierung

**[0071]** Das Peptidamid von Schritt 5 (180 g) wurde in Acetonitril (10,3 l) suspendiert, und es wurde Wasser (10,3 l) unter Mischen zugegeben, um eine Lösung vorzusehen. Diese Lösung wurde dann unter Mischen in Wasser (186,2 Liter) gegeben. Eine Lösung von Ammoniak in Wasser (3,5 % w/v) wurde der Peptidamidlösung zugegeben, um den pH-Wert auf 9,0 ± 0,25 einzustellen. Die Menge an Ammoniak, die erforderlich war, betrug ungefähr 2,0 ml/g rohes Peptidamid. Falls der pH-Wert 9,25 überschritt, wurde Essigsäure zugegeben, um den pH-Wert in den erforderlichen Bereich zu bringen. Eine Lösung von EDT in Acetonitril (1 % v/v, 207 ml) wurde der Peptididlösung zugegeben. Die resultierende Lösung wurde gerührt, bis die Cyclisierung vollendet war, unter Überwachung durch HPLC in 1-1,5-Stunden-Intervallen. Der Endpunkt der Reaktion galt dann als erreicht, als die Menge an vollständig reduziertem linearem Peptidamid auf unter 2,5 % abfiel, wie durch eine analytische HPLC bewertet.

**[0072]** Das HPLC-Analyseverfahren, das zur Überwachung der Cyclisierung angewandt wurde, war wie folgt:

Puffer A	6 mM HCl/Wasser
Puffer B	Acetonitril
Säule	Waters SymmetryShield RP <sub>8</sub> 3,5 µm 100 Å, 150 × 4,6 mm
Gradient	10 bis 35% Puffer B in Puffer A über 30 Minuten
Fließrate	1 cm <sup>3</sup> /min
Wellenlänge	204 nm
Injektionsvolumen	10 µl
Temperatur	30°C
Peakbreite	1,0
Peakempfindlichkeit	0,4

### Patentansprüche

1. Verfahren für die Festphasen-Synthese von c[Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys]-NH<sub>2</sub>, cyclisiert durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys und Mpr, welches folgendes umfasst

- (i) Anheften der Thiol-Seitenkette von Fmoc-Cys-NH<sub>2</sub> an einen geeigneten reaktiven festen Träger;
- (ii) Durchführen einer Festphasen-Peptidsynthese zur Bildung eines linearen Peptidamids;
- (iii) Abspalten des linearen Peptidamids von dem festen Träger, um ein lineares Peptidamid der Sequenz Mpr-S-S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub>, HS-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub> oder -[S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub> zu erhalten; und
- (iv) Cyclisieren des Peptidamids, um c[Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys]-NH<sub>2</sub>, cyclisiert durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys und Mpr, zu bilden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, welches folgendes umfasst:

- (i) Anheften der Thiol-Seitenkette von Fmoc-Cys-NH<sub>2</sub> an einen geeigneten reaktiven festen Träger;
- (ii) Durchführen einer Festphasen-Peptidsynthese ohne der Verwendung von Schutzgruppen auf der Seitenkette von Homoarginin zur Bildung eines linearen Peptidamids;
- (iii) Abspalten des linearen Peptidamids von dem festen Träger, um ein lineares Peptidamid der Sequenz H-S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub> zu erhalten; und
- (iv) Cyclisieren des Peptidamids, um c[Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys]-NH<sub>2</sub>, cyclisiert durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys und Mpr, zu bilden.

3. Verfahren gemäß entweder Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der feste Träger 4-Methoxytritylpolystyrol ist.

4. Verfahren gemäß einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei Fmoc-Arg und Fmoc-Har ohne die Verwendung einer Seitenketten-Schutzgruppe gekoppelt werden.

5. Disulfid-Dimer eines Peptidamids, das eine Har-G-D-Gruppierung umfasst.

6. Disulfid-Dimer gemäß Anspruch 5, gewählt aus der Gruppe, die aus folgendem besteht:

- [S-Mpr-A-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-P-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-G-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-Aib-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-(N-Me-Arg)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-(N-Me-Ser)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-(D-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-(B-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-(N-Me-Leu)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-(N-Me-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-Sar-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-V-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-Har-G-D-W-P-A-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- (S-Mpr-Har-G-D-W-P-(N-Me-Ala)-C-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>
- [S-Mpr-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- (S-Mpr-Har-G-D-W-P-(D-Ala)-C-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>
- [S-Mpr-Har-G-D-W-P-P-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>
- [S-Mpr-Har-G-D-W-P-Sar-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>

-[S-Mpr-Har-G-D-W-P-Aib-C-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-A-Har-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-A-K-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>  
 -[S-Mpr-D-Har-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>.

7. Disulfid-Dimer gemäß entweder Anspruch 5 oder 6, welches die Sequenz -[S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub> besitzt.

8. Peptidamid, das eine Har-G-D-Gruppierung umfasst, umfassend eine zusätzliche Thiol-haltige Verbindung, die durch eine Disulfidbindung an einem Thiol in dem Peptidamid gebunden ist.

9. Peptidamid gemäß Anspruch 8, gewählt aus der Gruppe, die aus folgendem besteht:

Mpr-S-S-Mpr-A-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-P-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-G-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Aib-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(N-Me-Arg)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(N-Me-Ser)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(D-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(B-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(N-Me-Leu)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-(N-Me-Ala)-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Sar-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-V-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-A-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-(N-Me-Ala)-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-(D-Ala)-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-P-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-Sar-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-Har-G-D-W-P-Aib-C-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-A-Har-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-A-K-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>  
 Mpr-S-S-Mpr-D-Har-G-D-W-P-Pen-NH<sub>2</sub>.

10. Peptidamid gemäß Anspruch 8, welches die Sequenz Mpr-S-S-Mpr-Har-Gly-Asp-Trp-Pro-Cys-NH<sub>2</sub> aufweist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen