



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 285 097 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1

Patentgesetz der DDR

vom 27. 10. 1983

in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 K 7/06

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 07 K / 329 831 3

(22) 21.06.89

(44) 05.12.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Beyernmann, Michael, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Bienert, Michael, Dr. sc. Dipl.-Chem.; Egler, Heinz, Dipl.-Chem.; Häupke, Klaus, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Krause, Eberhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Schwarz, Justus, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Walz, Harry, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

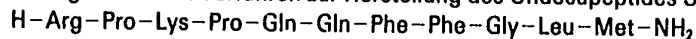
(73) Institut für Wirkstoffforschung der Akademie der Wissenschaften, Berlin, 1136; VEB Berlin-Chemie, Berlin, 1199; VEB Chemiekombinat Bitterfeld, Bitterfeld, 4400, DD

(74) Institut für Wirkstoffforschung der Akademie der Wissenschaften, AG Patente, Alfred-Kowalke-Straße 4, Berlin, 1136, DD

(54) Verfahren zur Herstellung des Undecapeptides Substanz P

(55) Undecapeptid; Substanz P; Festphasensynthese; Dipeptid; harzgebundenes Nonapeptid; Reinigung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung des Undecapeptides Substanz P, Formel I



Z-Arg(NO₂)-Pro-OH II wird in einem Ein-Topf-Verfahren durch Mischanhydrid-Synthese in Gegenwart von N-Hydroxybenztriazol hergestellt und mit am Benznydrylaminharz aufgebauten Nonapeptid III verknüpft, wobei Methionin ungeschützt, aber auch als Methionin-S-Oxid eingesetzt werden kann. Die polymergebundenen Undecapeptide IV werden mit HF behandelt und das Peptid vom Polymer mit verdünnter Essigsäure, oder aber bei teilweise oder vollständigem Vorliegen des S-Oxid-Peptides mit einem Gemisch von Trifluoressigsäure/Dimethylsulfid/Chlorwasserstoff reduzierend extrahiert. Das erhaltene Rohpeptid I wird an Carboxymethylcellulose in einem linearen Ammoniumacetat-Gradienten gereinigt und anschließend an einem Polyacrylester-Polymer, das eine überraschend hohe Kapazität für Substanz P hat, entsalzt. Die Elution des gebundenen Undecapeptids erfolgt stufenweise oder durch einen linearen Gradienten eines Acetonitril-Essigsäure-Gemisches, wobei Substanz P auch im industriellen Maßstab in hoher Reinheit erhalten werden kann.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung des Undeca-peptides Substanz P der Formel I



durch Festphasensynthese, **gekennzeichnet dadurch**, daß

- a) das Z-Arg(NO₂)-OH und Prolin mittels Mischanhydrid-Synthese in Gegenwart von N-Hydroxybenztriazol zum Dipeptid der Formel II



umgesetzt wird,

- b) das gewonnene Dipeptid der Formel II mit polymergebundenem Nonapeptid der Formel III,



worin X = Met oder Gemisch Met und Met(0) oder Met(0),

BHA = Benzhydrolamin-Harz bedeuten,

zum Undeca-peptid der Formel IV,

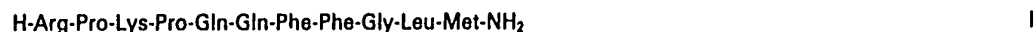


umgesetzt wird,

- c) das hergestellte Undeca-peptid IV mit HF unter Zusatz von Scavengern deblockiert wird und das Rohpeptid der Formel I im Fall von X = Met vom Polymer mit verd. Essigsäure extrahiert wird oder im Fall von X = Met/Met(0) bzw. X = Met(0) mit einem Gemisch von Trifluoressigsäure/Dimethylsulfid/Chlorwasserstoff extrahiert wird,
- d) das so isolierte Roh-Undeca-peptid I nach einer Ionenaustauschreinigung von Carboxymethyl-Cellulose einer anschließenden Entsalzung an einem porösen Copolymer aus Vinylbenzen und Acrylsäuremethylester unterworfen wird, wobei die Elution des gebundenen Undeca-peptides mit Gemischen aus organischen polaren Lösungsmitteln und wäßrigen Säuren erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß Z-Arg(NO₂)-OH mit einem Chlorameisensäureester zum Mischhydrid umgesetzt wird, das anschließend zunächst mit N-Hydroxybenztriazol und nachfolgend mit Prolin unter Bildung des Dipeptides der Formel II zur Reaktion gebracht wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß Prolin gelöst in einem organischen polaren Lösungsmittel, vorzugsweise Dimethylformamid, und Wasser eingesetzt wird, wobei kein Zusatz einer organischen oder anorganischen Base erfolgt.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Elution vom Polyacrylester-Harz stufenweise mit einem Gemisch, bestehend aus 30-60 Vol.-% Acetonitril und 40-70 Vol.-% 0,5 M Essigsäure oder mit einem linearen Gradienten, der 0-40 Vol.-% Acetonitril neben 0,5 M Essigsäure enthält, erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine neues Verfahren zur Herstellung von Undeca-peptiden, speziell der Substanz P



Das Peptid eignet sich zur Herstellung von Arzneimitteln, die zur Behandlung von bestimmten streßinduzierten Disregulationen des Schlafprofils eingesetzt werden. Die Anwendungsgebiete der Erfindung liegen in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Synthese des Undeca-peptides Substanz P ist mehrfach beschrieben worden. Für die Herstellung kleiner Mengen des Peptides überwiegt dabei die Festphasensynthese, während für die Bereitstellung größerer Substanzmengen ein Herstellungsverfahren durch klassische Synthese in Lösung ausgearbeitet wurde (DD 139 125).

Bei der Festphasensynthese wird der Aufbau generell stufenweise vorgenommen, wobei als Polymere Chlormethylharz, Polyacrylamid-Träger, Benzhydrylaminharz Verwendung finden. Als N^α-Schutzgruppen werden Boc oder Fmoc, als N^ε-Schutzgruppe Boc, Z, Z(oCl), als Arginin-Seitenkettenschutz NO₂, Mtr, Tos eingesetzt. Met wird nicht geschützt. Gln wird als oNp-Ester oder aber als Gln(Xan) eingesetzt. Kupplungen werden mit DCC oder DCC/HOBt, Deblockierungen mit TFA, HCl/Dioxan oder HCl/Dioxan/1% Mercaptoethanol durchgeführt. Die Abspaltung vom Benzhydrylaminträger erfolgt durch HF, vom Chlormethylträger durch Ammonolyse, vom Polyarylamid-Träger mit TFA. Zur Schutzgruppenabspaltung wird auch die katalytische Transferhydrierung herangezogen. Reinigungen des Rohproduktes werden durch Ionenaustauschchromatographie, Verteilungschromatographie, HPLC, Gelchromatographie erreicht, wobei Ausbeuten und Reinheit des Endproduktes nur selten angegeben werden (US 3862114, US 3912711, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 9, 423-425 [1979], J. Med. Chem. 19, 854-856 [1976], Arch. int. Pharmacodyn. 240, 193-202 [1979], Can. J. Biochem. 58, 272-280 [1980], Proc. 13th Europ. Pept.-Symp. Israel 1974, Ed. Wolman, Wiley & Co, New York 1975, S. 105-111, ibid, S. 113-116, J. Org. Chem. 48, 1757-1760 [1982], Ind. J. Chem. 25, 1045-1049 [1986]).

Werden die beschriebenen Synthesen unter dem Gesichtspunkt der industriellen Peptidsynthese bewertet, so weisen sie erhebliche Mängel auf:

Herstellungsverfahren auf der Basis von Polyarylamid-Trägern, Fmoc-, Xan-, Mtr, Z(oCl)-Schutzgruppen sind unakzeptabel kostspielig und erfordern darüber hinaus einen hohen Syntheseaufwand. Chlormethylträger erfordern zur vollständigen Abspaltung der Peptidkette eine Ammonolyse, die bei C-term. Methionin 1-2 Wochen dauert und dann von Nebenreaktionen vor allem am Arginin-Rest begleitet ist.

Basis für die industrielle Herstellung von Substanz P sollte deshalb die Verwendung von BHA-Träger, Boc, Z, NO₂-Schutzgruppen, DCC/HOBt-Kupplungen und HCl/Dioxan-Deblockierung sein. Das an sich für die Herstellung kleinerer Substanzmengen (< 1 g) bekannte Verfahren (US 3862114) weist allerdings weitere Nachteile auf:

Das einzusetzende Z-Arg(NO₂)-OH ist ein nur schwer zu kristallisierender Stoff, der bei der technischen Herstellung als langsam erstarrendes Öl entsteht und damit nicht frei von Verunreinigungen ist. So konnten in Z-Arg(NO₂)-OH sowohl ein Laktam als auch eine Ornithinverbindung nachgewiesen werden. Die Verwendung dieses Produktes führt zu Substanz P-Rohpeptiden schlechterer Qualität.

Die Kupplung an das Prolin des Decapeptidharzes verläuft überdies aufgrund von starker Laktambildung während der Aktivierung des Z-Arg(NO₂) langsam und unvollständig. Von großem Vorteil wäre deshalb die Einführung des Z-Arg(NO₂)-OH als hervorragend kristallisierendes und in hochreiner Form herstellbares Z-Arg(NO₂)-Pro-OH, dessen Herstellung nach bekannten Verfahren (Helv. Chim. Acta. 43, 1349 [1960], Justus Liebigs Ann. Chem. 642, 145 [1961]) aufwendig und in unbefriedigenden Ausbeuten verläuft. So muß zunächst der Dipeptidester Z-Arg(NO₂)-Pro-OMe hergestellt werden, der nachfolgend zu II verseift wird. Die Herstellung des Esters mittels DCC führt zu starker Laktambildung. Die Laktambildung ist auch bei Verwendung von o-Dinitrophenol/DCC nicht wesentlich vermindert oder zu senken (Chem. Pharm. Bull. 35, 2250-2553 [1987]), in Übereinstimmung mit eigenen Ergebnissen und entgegen einer früheren Mitteilung (Chem. Pharm. Bull. 21, 2500-2506 [1973]).

Von Nachteil bei der Herstellung von Methionin-enthaltenden Peptiden im allgemeinen und speziell bei der Herstellung von Substanz P ist die leichte Oxydierbarkeit der Methioninseitenkette unter Bildung von Methionin-S-oxid. Dies kann durch Zusatz von Mercaptoethanol zum Deblockierungsmittel 4N HCl/Dioxan, wie in US 3862114 beschrieben, vermindert, aber nicht völlig verhindert werden. So enthalten Substanz P-Rohpeptid-Chargen trotz Mercaptoethanol-Zusatz 1-10% Substanz P-S-oxid, das durch Ionenaustauschreinigung nicht entfernt werden kann. Es ist deshalb üblich, vor der Endreinigung die Methioninpeptide noch einem separaten S-oxid-Reduktionsschritt zu unterwerfen, was arbeitsaufwendig ist und zudem teilweise teure und/oder giftige Reduktionsmittel erfordert. Die Inkubation von Substanz P-S-oxid mit Mercaptoethanol bei 50°C für 20 Std. (Int. J. Pept. Protein Res., 14, 169-179 [1979]) liefert keine vollständige Reduktion, aber eine Reihe von Nebenprodukten. Unvollständig bleibt nach eigenen Untersuchungen auch die Reduktion mit Ammoniumiodid in Trifluoressigsäure (Rac. trav. chim. 97, 1-6 [1978]) oder mit Dithiothreitol (siehe z. B. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1981, 528). Reduktion mit Mischungen von 20 Vol.-% HF/ 80 Vol.-% DMS (J. Amer. Chem. Soc. 105, 6442-6455 [1983]) sind im Laborexperiment sehr effektiv, im Großmaßstab aber nicht praktikabel, da die HF/DMS-Mischungen nur sehr langsam abdestillierbar sind. Mischungen von Dimethylsulfid in TFA sind in Gegenwart von Chloridionen starke Reduktionsmittel für Cys(x)-S-oxide (Int. J. Peptide Protein Res. 28, 498 [1986]).

Von Nachteil bei den oben angegebenen Herstellungsverfahren sind schließlich auch die Reinigungsverfahren, die lediglich im Labormaßstab praktikabel sind. Die HPLC ist ein hocheffektives Verfahren auch für die Reinigung von Substanz P. Die Methode ist aber sehr kostenaufwendig und erfordert einen hohen instrumentellen Aufwand. Die Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose ist dagegen bei Rohpeptiden guter Qualität ebenfalls effektiv. Die Ionenaustausch-Reinigung von Substanz P wird allerdings durch seine hohe Tendenz zur Aggregation erschwert, so daß in Gegenwart von Harnstoff chromatographiert wurde (Can. J. Biochem. 58, 272-280 [1980]). Nachteilig bei Ionenaustauschverfahren ist auch der hohe Salzgehalt vom Eluat, was nachfolgende Gelfiltration oder mehrfaches Lyophilisieren (bei flüchtigen Puffern) erfordert. Lyophilisierungen von Peptidlösungen mit flüchtigen Salzen sind im technischen Maßstab aufgrund der hohen Belastung der Pumpen schwierig zu realisieren.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein einfaches Verfahren zur industriellen Herstellung des Undecapeptides Substanz P, Formel I, durch Festphasensynthese zu entwickeln.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein einfaches Verfahren zur Herstellung des Undecapeptides Substanz P zu entwickeln, nach dem das Peptid durch Anwendung der Festphasensynthese auch im industriellen Maßstab in hoher Ausbeute und Reinheit herstellbar ist.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß in einer Ein-Topf-Reaktion Z-Arg(NO₂)OH mit Chlorameisensäureestern, insbesondere mit Chlorameisensäureisobutyl- oder -isopropylester zum Mischanhydrid umgesetzt wird und dieses erfindungsgemäß zunächst mit N-Hydroxybenzotriazol und nachfolgend mit Prolin zur Reaktion gebracht wird, wobei Z-Arg(NO₂)-Pro-OH II in hoher Ausbeute und Reinheit hergestellt wird. Prolin wird in organischen polaren Lösungsmitteln, vorzugsweise in DMF, in Gegenwart von Wasser, dem Reaktionsgemisch zugesetzt, wobei das an sich übliche Zusetzen einer organischen Base, wie N-Methylmorpholin oder Triethylamin, überraschenderweise nicht notwendig ist.

Das so gewonnene Dipeptid wird an polymergebundenes Nonapeptid der Formel III



III

in an sich bekannter Weise, vorzugsweise mittels DCC/HOBt, gekuppelt, wobei X Met, Met(O) oder ein Gemisch von Met und Met (O) bedeutet, und das so hergestellte Undecapeptidderivat der Formel IV,



IV

mit HF unter Zusatz von Scavengern, insbes. Anisol und Dimethylsulfid, deblockiert wird. Das erhaltene Substanz P-Rohpeptid wird vom Polymer mit Essigsäure, vorzugsweise 30%ig, extrahiert, wenn X ausschließlich als Met vorliegt, oder aber erfindungsgemäß bei teilweise oder vollständigem Vorliegen des S-Oxid-Peptids (X = Met/Met(O) bzw. X = Met(O)) mit einem Gemisch von Trifluoressigsäure/Dimethylsulfid/Chlorwasserstoff in Eisessig, vorzugsweise im Vol.-Verhältnis 7:1,5:1,5, für 15–45 min bei Temperaturen von 15–25°C extrahiert. Das nun S-Oxid-freie Rohpeptid wird in 30–50%igem wäßrigen Acetonitril gelöst und in an sich bekannter Weise an Carboxymethyl-Cellulose in Ammoniumacetat-Puffer (0,01–0,35 M, pH 6,0) gereinigt und das Eluat erfindungsgemäß einer anschließenden Entsalzung an einem porösem Copolymer aus Vinylbenzen und Acrylsäuremethylester unterworfen. Die Elution des gebundenen Undecapeptides erfolgt mit Gemischen organischer, polarer Lösungsmittel und wäßrigen Säuren, vorzugsweise mit Acetonitril/wäßriger Essigsäure im Vol.-Verhältnis 1:1, oder aber mit einem linearen Gradienten, der 0–40% Acetonitril neben 0,5 M Essigsäure enthält, wobei Substanz P, I, in hoher Reinheit und Ausbeute erhalten wird.

Das Verfahren weist eine Reihe von Vorteilen auf:

Die Ankupplung des Arginin-Restes als Dipeptid Z-Arg(NO₂)-Pro-OH, II, umgeht auftretende Probleme mit der Qualität des schlecht kristallisierenden Z-Arg(NO₂)-OH, das bei techn. Ansätzen bisweilen Nebenprodukte wie Ornithinderivate und/oder Laktame enthält.

Z-Arg(NO₂)-Pro-OH kristallisiert dagegen hervorragend und wird in hoher Reinheit hergestellt. Das Dipeptid Z-Arg(NO₂)-Pro-OH läßt sich darüber hinaus problemloser und schneller an das polymergebundene Nonapeptid kuppeln, als vergleichsweise Z-Arg(NO₂)-OH an das Decapeptid, was bekanntermaßen auf die hohe Tendenz von Argininderivaten zurückzuführen ist, bei der Aktivierung Laktame zu bilden und sich so der Kupplungsreaktion zu entziehen.

Der sinnvolle Einsatz des Dipeptides Z-Arg(NO₂)-Pro-OH für die Substanz P-Herstellung war allerdings an das Auffinden einer effizienteren Synthesvariante gebunden. Wir haben überraschenderweise festgestellt, daß die Kupplung von Z-Arg(NO₂)-OH an Prolin ohne Urethanbildung und ohne Laktambildung besonders vorteilhaft möglich ist, wenn man das aus Z-Arg(NO₂)-OH und Chlorameisensäureester gebildete Mischanhydrid zunächst mit HOBt reagieren läßt und erst dann Prolin zusetzt, wobei unerwarteterweise aus dann hohe Ausbeuten an Dipeptid erhalten werden, wenn Prolin in wäßrigem DMF ohne Basezusatz zugesetzt wird. Das Dipeptid ist so nach Umkristallisation in 60–70% Ausbeute in hoher Qualität herstellbar, während andere Verfahren (Helv. Chim. Acta 43, 1349 [1960], Justus Liebig's Ann. Chem. 642, 145 [1961]) über die Isolierung des Dipeptidesters nur 25–40% liefern und Versuche, das Dipeptid direkt über o-Dinitrophenylester herzustellen (Chem. Pharm. Bull. 21, 2500 [1973]), bei uns und anderen (Chem. Pharm. Bull. 35, 2550 [1987]) unakzeptable Laktambildung lieferten.

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß ohne zusätzliche Operation, im Rahmen der notwendigen Extraktion des Rohpeptides vom Polymer nach der HF-Abspaltung, eine ggf. notwendige Reduktion von S-Oxid erfolgt. Die reduktive Extraktion wird mit einem Gemisch von TFA/DMS/Chlorwasserstoff durchgeführt und ist nach 30–45 min quantitativ. Die Lösung wird unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingengt und das Peptid durch Fällern mit Ether oder Essigester oder Isopropanol/Essigester in einfacher Weise isoliert. Der Gehalt an S-Oxid der erhaltenen Roh-Substanz P ist <0,2%, was für die nachfolgende Reinigung von großem Vorteil ist. Das erfindungsgemäße Verfahren der reduktiven Extraktion gestattet auch den Einsatz von Met(O) zum Aufbau des Peptides. Dies hat den weiteren Vorteil, daß der Thioetherschwefel des Met-Restes, während der HF-Behandlung weitgehend geschützt bleibt und einer sonst zu beobachtenden S-Benzilylierung (3–10 Fl.-% HPLC) durch Benzylkationen oder Benzylfluorid nicht zugänglich ist. Auch die Entsalzung der Substanz P-Eluate, erhalten nach der Ionenaustauschchromatographie, die erfindungsgemäß an dem Polyacrylester-Harz durchgeführt, ist im Vergleich zu bekannten Verfahren vorteilhaft. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß dieses Polymer eine sehr hohe Bindungskapazität für Substanz P aufweist (15–20 mg Peptid/1 ml Polymer). Dies gestattet es, die Entsalzung an kleineren Säulen und unter Einsatz geringerer Lösungsmittelmengen durchzuführen, als dies bei Einsatz anderer Polymere oder C-18-Kieselgelen – die zudem sehr teuer sind – möglich wäre. Das Verfahren ist deshalb für die industrielle Peptidentersalzung sehr gut geeignet und führt darüber hinaus zu einem zusätzlichen Reinigungseffekt, wenn die Elution des gebundenen Peptides vom Polymer mit einem Gradienten steigenden Acetonitrilgehaltes erfolgt. Ein Vorteil des Verfahrens besteht auch im Vermeiden der Lyophilisation von Eluaten mit flüchtigen Puffern, die technisch nur schwer zu realisieren ist.

Die folgenden Beispiele sollen das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Substanz P näher erläutern:

Ausführungsbeispiele**Beispiel 1: Herstellung von Z-Arg(NO₂)-Pro-OH**

136,4g (0,386 Mol) Z-Arg(NO₂)-OH werden im 4-l-Kolben unter Rühren in 1,2l DMF gelöst. Zu der Lösung werden 53,5ml (0,386 Mol) Triethylamin gegeben. Man kühlt auf -15°C (± 3°C) und gibt unter starkem Rühren den Chlorameisensäureester (0,380mol Chlorameisensäureisobutyl- oder isopropylester) über einen Tropftrichter innerhalb von 3 bis 5 min zu, wobei die Temperatur nicht über -5°C steigen darf. Es wird noch 5 min. bei einer Temperatur von -10°C bis -5°C gerührt. Nun wird die Lösung von 57,4g (0,425 Mol) getr. HOBt in 60ml DMF zugesetzt und bei -5°C ± 3°C gerührt. Nach 1 Std. wird schließlich auf -10°C gekühlt und die auf +10 bis 15°C vorgekühlte Lösung von 62,2g (0,54 Mol) L-Prolin in 580ml DMF/110ml Wasser (bei niedrigeren Temp. kristall. Prolin wieder aus) zugegeben, wobei die Temperatur im Kolben 0°C nicht übersteigen sollte. Das ursprünglich auskristallisierte TEA-HCl löst sich wieder. Die klare, leicht gelbliche Lösung wird noch 2 Std. bei -5 bis 0°C gerührt (DC-Kontrolle, wie in 4. angegeben). Man läßt über Nacht im Kühlschrank stehen (auch Raumtemperatur ist möglich; die Reaktion ist bereits nach dem zweistündigen Rühren beendet).

Am Vakuumrotationsverdampfer (Badtemp. 45°C) werden zunächst im Wasserstrahlvakuum etwa 700ml abdestilliert und schließlich im Ölpumpenvakuum zum öligen Rückstand eingeeengt.

Der Rückstand wird in 1l Methylenchlorid aufgenommen und 3x mit je 250ml 5%iger NaHSO₄-Lsg. ausgeschüttelt. Man wäscht die organische Phase 2x mit 10%iger wäßriger NaCl-Lsg.

Bei den Extraktionen kommt es zur langsamen Abscheidung eines weißen Kristallises, F 158-160°C, bei dem es sich um HOBt handelt. Durch Filtration der Lösungen werden 17g HOBt zurückerhalten. Die Methylenchlorid-Lösung wird mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, der Filterkuchen mit 2x 150ml CH₂Cl₂ nachgewaschen und die vereinigten Filtrate am Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt. Der noch feuchte Rückstand beginnt bereits zu kristallisieren. Es werden schnell 400ml Methanol zugesetzt und die Kristallisation durch Stehen im Kühlschrank für 1 Std. vervollständigt. Der krist. Niederschlag wird mit einer G3-Fritte abgesaugt, 2x mit je 150ml MeOH durchgerührt und jeweils abgesaugt und schließlich luftgetrocknet.

Ausbeute 130-145g (75-82%)

Das Rohprodukt wird in einem 2-l-Rundkolben unter Erwärmen in 1l Methanol/Wasser 1:1 gelöst. Eine geringe Trübung wird abgesaugt. Das Filtrat beginnt sofort zu kristallisieren. Nach 3 Std. wird abgesaugt und mit Methanol/Wasser 1:1 (100ml) nachgewaschen und luftgetrocknet.

Ausbeute 114-123g (65-70%, bezogen auf eingesetztes Z-Arg(NO₂)-OH)

C₁₉H₂₆O₇N₆ · H₂O (450,4 + 18)

Ber.: C 48,71 H 6,02 N 17,94

Gef.: C 48,85 H 6,15 N 17,65

F: 107-111°C (langsames Erweichen)

[α]_D²⁰ = -27,8° (C = 1, DMF)

DC (Merck-Fertigplatten Kieselgel 60, Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser = 120:20:6:11); R_f 0,3

HPLC (LiChrosorb RP-18, 10°, Säule 3,6 x 250mm, 1 ml/min Acetonitril 33%, 0,1 M NaH₂PO₄ + 0,15M NaClO₄, pH 2,0 67%)

t_R 5,6 min, 97,8Fl.-%

Beispiel 2: Herstellung von Z-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH-BHA

Benzhydrylamin-hydrochlorid-Polymer UR 95 (CKB, Wolfen, DDR), (58,9g bei einer Kap. von 0,85mMol NH₂/g) wird in einen 600-ml-Frittenreaktor einer Eigenbau-Syntheseapparatur mit automatischer Steuerung (Transport der Reagenzien durch N₂-Druck, Mischen des Harzes diskontinuierlich durch N₂) gegeben und mit DCM, Chlf./MeOH 2:1, DCM gewaschen und dann durch Reaktion mit TEA/Chlf. (1:9) und DCM in die freie Amin-Form überführt.

125mMol Boc-Met in DCM und 125mMol HOBt in DMF werden vereinigt, nach Kühlen mit 25mMol DCCl in DCM versetzt und nach 1/2 Std. vom Harnstoff abfiltriert. Das Filtrat wird zum Harz in den Reaktor gegeben und 1 Std. mittels N₂ diskontinuierlich durchmischt. Der Kaiser-Test/1/ ist nahezu negativ. Es wird mit Ac₂O/TEA in DMC für 20 min nachacetyliert und anschließend mit DCM gewaschen. Der Kaiser-Test ist nun negativ. Zur Boc-Abspaltung wird mit DCM gewaschen, dann mit 4N HCl/Dioxan/1% ME 10 min, nachfolgend mit dem gleichen Reagenz 25 min deblockiert und schließlich wieder mit DCM gewaschen. Anschließend wird durch Waschen des Peptidpolymerhydrochlorides mit TEA/Chlf. 1:9 die N-terminale Aminogruppe deprotoniert. Der Cyclus wurde nacheinander mit Boc-Leu · H₂O, Boc-Gly- und Boc-Phe wiederholt, wobei die Kupplungszeiten auf 3-4 Std. verlängert werden. Nachacetylierungen sind nach den Boc-Leu- und Boc-Gly-Kupplungen nicht erforderlich.

1 Anal. Biochem. 34, 595 (1970).

Schem 1. Aufbau von geschützter Substanz P am Polymer UR 95

Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met	Operation
										Boc-OH BHA P	a, b(1), e, d
										Boc-OH BHA P	f, a
										H ₂ N BHA P	b(3,5), e
										Boc-OH BHA P	f, a
										Boc-OH BHA P	b(3), e
										Boc-OH BHA P	f, a
										Boc-OH BHA P	b(4), e, d
										Boc-OH BHA P	f, a
										Boc-OH BHA P	b(4), e, g, c(16), e, d
										Boc-OH BHA P	f, a
										Boc-OH BHA P	b'(4), e', g, c'(4), e', g, c'(9), e', d'
										Boc-OH BHA P	f, a
										Boc-OH BHA P	b'(4), e', g, c'(4), e', d'
										Boc-OH BHA P	f, a
										Boc-OH BHA P	b'(3), e', g, c'(16), e', g, c'(9), e', d'
										Boc-OH BHA P	f, a
										Boc-OH BHA P	b'(18), e', g, c'(18), e', d'
										Boc-OH BHA P	f, a
										Boc-OH BHA P	b'(17), e', g, c'(17), e', h
										H ₂	

Einsatz: 58,9 g UR 95 (50 mol H₂-Gruppen)

- Vorwaschung und Waschung nach Deblockierung: 5 x je 3 min DCH, 3 x je 3 min DCH/MeOH (2:1), 3 x je 3 min DCH, 4 x je 3 min TBA/DCH (1:1), 6 x je 3 min DCH (jede Operation mit 200 ml)
- Voraktivierung/Kupplung: 120 ml Boc-HS in 60 ml DCH, + 120 ml MeOH in 30 ml DCH, kühlen, + 84 ml 1,5 M DCC-Lsg. in DCH, nach 1/2 bis 1 Std. Filtration, Filtrat auf Herz (Reaktionszeit (Std.))
- Voraktivierung/Kupplung: wie (b), aber Boc-HS bzw. Dipeptid + HBT und DCC in DCH gelöst, nach 1/2 - 1 Std. Filtration, Filtrat auf Herz (Reaktionszeit (Std.))
- Wachstum mit voraktivierter Boc-HS bzw. Dipeptid: wie (b), aber halbiertes Ansatz (51 ml Boc-HS in 30 ml DCH u.s.w.) (Reaktionszeit (Std.))
- Wachstum mit voraktivierter Boc-HS bzw. Dipeptid: mit halbierten Ansatz in DCH gemäß (b') (Reaktionszeit (Std.))
- Wachstum mit voraktivierter Boc-HS bzw. Dipeptid: 9 ml MeOH und 15,5 ml TBA in 135 ml DCH, 1 x 20 min, 3 x je 3 min 200 ml DCH
- Wachstum mit voraktivierter Boc-HS bzw. Dipeptid: 9 ml MeOH und 15,5 ml TBA in 135 ml DCH, 1 x 20 min, 3 x je 3 min 200 ml DCH
- Wachstum mit voraktivierter Boc-HS bzw. Dipeptid: 3 x je 3 min DCH, 4 x je 3 min DCH/MeOH, 3 x je 3 min DCH (je 200 ml)
- Wachstum mit voraktivierter Boc-HS bzw. Dipeptid: 3 x je 3 min DCH, 4 x je 3 min DCH/MeOH (2:1), 3 x je 3 min DCH
- Wachstum mit voraktivierter Boc-HS bzw. Dipeptid: 3 x je 3 min DCH, 1 x 10 min 4 M HCl/Dimethylformamid (DMF) 2:1, 1 x 20 min 4 M HCl/Dimethylformamid (DMF) 2:1, 3 x je 3 min DCH (je 200 ml)
- Wachstum mit voraktivierter Boc-HS bzw. Dipeptid: 2 x je 3 min DCH, 4 x je 3 min DCH (je 200 ml)
- Wachstum mit voraktivierter Boc-HS bzw. Dipeptid: 3 x je 3 min DCH, 3 x je 3 min DCH/MeOH (2:1), 2 x je 3 min DCH, 8 x je 3 min DCH

Die Ankupplung des zweiten Boc-Phe in analoger Weise liefert einen stark positiven Kaiser-Test. Es erfolgt deshalb eine Zwischenwäsche mit TEA/Chlf. und nachfolgend mit DCM; dann erfolgt eine zweite Kupplung mit je 63 mMol Boc-Phe, HOBT und DCCl in DCM/DMF für 16 Std.

Die Kupplung mit Boc-Gln wird wegen der Schwerlöslichkeit des Derivates nicht in DCM, sondern in DMF durchgeführt. Der Kaiser-Test ist stark positiv und es sind zwei Nachkupplungen mit je 63 mMol aktivierter Boc-Aminosäure (nach jeweiliger TEA/DCM-Zwischenwäsche) und eine anschließende Acetylierung mit Ac_2O /TEA/DCM erforderlich, um einen nahezu negativen Kaiser-Test zu erzielen. Das zweite Boc-Gln erfordert dagegen nur eine Nachkupplung und eine Acetylierung.

Die weiteren Aminosäurederivate Boc-Pro und Boc-Lys(Z) sowie das Dipeptid Z-Arg(NO_2)-Pro-OH II werden ebenfalls in DMF gekuppelt, wobei für Boc-Pro zwei Nachkupplungen und eine Acetylierung, für Boc-Lys(Z) und für Z-Arg(NO_2)-Pro-OH nur eine Nachkupplung ohne Nachacetylierung erforderlich waren.

Das Peptid-Harz-Konjugat wird abschließend sorgfältig mit DMF, Chlf./MeOH 2:1, Methanol, Chlf./MeOH 2:1, DMF und DCM gewaschen, um Reste niedermolekularer Verunreinigungen (DCCl, Harnstoff, HOBT) zu entfernen und getrocknet.

Der Ablauf der Synthese am BHA-Harz ist im Schema 1 zusammengefaßt.

Beispiel 3: Herstellung von Z-Arg(NO_2)-Pro-Lys(Z)-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met(O)-NH-BHA.

Die Herstellung erfolgt gemäß Beispiel 2, wobei Boc-Met durch Boc-Met(O) und 4 N HCl/Dioxan/1 % Mercaptoethanol durch 4 N HCl/Dioxan ersetzt werden.

Beispiel 4: Herstellung von H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met- NH_2 (I)-Rohprodukt

In den Reaktionsbehälter des HF-Reaktionsgerätes werden 10 g der bis zur Gewichtskonstanz getrockneten geschützten Substanz P IV eingefüllt, mit je 2 ml Anisol und 2 ml Dimethylsulfid versetzt, an das Gerät angeschlossen und die gesamte Apparatur mit einer Polypropylen-Wasserstrahlpumpe evakuiert. Durch Kühlung des Reaktionsbehälters auf -60°C mit Trockeneis-Aceton werden 40 ml mit Kobaltrifluorid vorgetrockneter Fluorwasserstoff auf das zu spaltende Produkt destilliert. Anschließend wird 90 min bei einer Badtemperatur von 0 bis $+5^\circ\text{C}$ magnetisch gerührt. Danach wird überschüssiger Fluorwasserstoff und Dimethylsulfid über einen mit Calciumoxid beschickten Absorptionsturm unter weiterem Rühren mittels Wasserstrahlpumpe innerhalb von 60 min abdestilliert.

Nach Abschrauben des Reaktionsbehälters wird der dickflüssige Rückstand mit 70 ml über KOH getrocknetem Ether verrührt, um Anisol und restliches Dimethylsulfid sowie Fluorwasserstoff herauszulösen. Das sich abscheidende Gemisch aus Trägermaterial und Rohpeptid wird mit weiteren 20 ml Ether festgerieben, mit einer G3-Glasfritte abgesaugt und 3mal mit je 10 ml Ether nachgewaschen. Nach kurzem Trocknen werden etwa 10 g Peptid-Trägersgemisch erhalten.

Der Peptidanteil einer kleineren Probe des Gemisches (10 mg) wird in 1 ml 5%iger Essigsäure gelöst und ein DC angefertigt (siehe Beispiel 5). Ein Nebenfleck für Arg(NO_2)-Substanz P (R_f 0,40; Substanz P 0,30) sollte bei befriedigend verlaufender Abspaltung nicht oder nur schwach nachweisbar sein.

Das Produkt wird bis zur Extraktion bei -20°C gelagert.

Zeigt das DC der HPLC einen Gehalt von Substanz P-S-Oxid von $>3\%$, oder wurde das Rohpeptid nach Beispiel 3 abgebaut, so erfolgt die Extraktion entsprechend Variante A. Ist der S-Oxid-Gehalt $<3\%$, kann nach Variante B extrahiert und isoliert werden.

A: 15 g Rohpeptid-Harz-Gemisch werden in eine Lösung von 14 ml TFA, 30 ml DMS und 30 ml 2 N HCl/HAc eingeführt. Die Suspension wird 30 min gerührt und dann über eine G3-Fritte filtriert. Das Harz wird 3x mit je 20 ml TFA gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden am Vakuumrotationsverdampfer bei $30-35^\circ\text{C}$ auf etwa 50 ml eingengt und das Rohpeptid wird durch Zugabe von 300 ml Essigester ausgefällt. Man läßt 1 Std. im Kühlschrank stehen, saugt ab und wäscht 2x mit je 20 ml Diethylether. Nach Trocknen im Vak. erhält man 5,1 g eines weißen Pulvers, HPLC (siehe Beispiel 5) Hauptpeak bei $t_R = 10,5$ min (I). Ein bei nicht-reduktiver Extraktion mit 30%iger Essigsäure nachweisbarer S-Oxid-Peak bei $t_R = 4,7$ min (5,7%) ist auf $<0,2\%$ verringert.

Das gleiche Ergebnis wird erhalten, wenn zur reduktiven Extraktion ein unter Verwendung von Met(O) (Beispiel 3) aufgebautes Rohprodukt zur Anwendung kommt. Der ursprüngliche S-Oxid-Gehalt von 89,3% wird ebenfalls auf $<0,2\%$ gesenkt. Die Bildung von S-Benzylsulfonium-Substanz P (HPLC: $t_R = 14,5$ min) ist deutlich geringer ($\sim 3\%$), wenn zur HF-Abspaltung das S-Oxid eingesetzt wird (sonst 5–9%).

Die Ausbeute an Rohpeptid I, bezogen auf eingesetztes Benzhydrylaminharz, beträgt 70–90%.

B: 50 g Rohpeptid-Polymer-Gemisch werden unter starkem Rühren in 900 ml 30%iger Essigsäure eingetragen. Nach 45 min wird filtriert und das Harz 3x mit je 50 ml 30%iger Essigsäure gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden am Vakuumrotationsverdampfer auf etwa 50–100 ml eingeeengt. Das Rohpeptid wird durch sukzessive Zugabe von 300 ml Isopropanol und 600 ml Essigester ausgefällt. Man läßt 1 Std. im Kühlschrank stehen, saugt ab, wäscht mit Essigester und schließlich mit Aceton nach und trocknet im Vakuum. Man erhält ein weißes Pulver in Ausbeuten von 70 bis 90%, HPLC: Hauptpeak bei $t_R = 10,5$ min (I, 75–85%l.-%)

Beispiel 5: Reinigung von I durch Ionenaustauschchromatographie und nachfolgende Entsalzung

20 g Rohpeptid werden in 0,8 l Acetonitril/dest. Wasser 1:1 (entgast) unter Rühren und gelindem Erwärmen (max. 40°C) weitgehend gelöst. Die Lösung wird über eine G4-Fritte filtriert und auf eine Säule, 50 cm $\times$ 8 cm, gefüllt mit 3 l CM-Cellulose, Servacel oder Reanal, Kap. 0,6–0,8 meq/g (äquilibriert mit 0,01 M NH_4Ac -Lösung pH 6,0) aufgetragen. Es wird mit einem Gradienten von 12,5 l 0,01 M NH_4Ac pH 6,0 und 12,5 ml 0,35 M NH_4Ac pH 6,0 eluiert. Der Hauptpeak wird mittels DC und HPLC charakterisiert und die entsprechenden Fraktionen vereinigt.

Das Eluat wird auf eine Glassäule, gefüllt mit 500 ml porösem Copolymer aus Vinylbenzen und Acrylsäureester (CKB Wolfen, DDR), 50–80 μ (vorher sorgfältig mit Methanol sowie Acetonitril und schließlich mit Wasser gewaschen) aufgetragen. Es wird mit 2 l dest. Wasser gewaschen. Die nachfolgende Elution kann in zweierlei Weise erfolgen:

A: Die Säule wird mit 1 l Acetonitril/0,5%ige Essigsäure 1:1 gewaschen. Die Substanz erscheint als scharfer Peak (UV-Kontrolle des Eluats bei 220 oder 260 nm) in einem Volumen von etwa 300 ml Eluat. Am Vakuumrotationsverdampfer wird auf ein kleines Volumen eingeeengt, mit 200 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt und lyophilisiert. Man erhält 8,50–11,0 g l (Gesamtausbeute, bezogen auf eingesetztes BHA-Harz: 38,3–49,5%, je nach Qualität des eingesetzten Rohproduktes)

$C_{63}H_{98}N_{18}O_{13}S \cdot 3CH_3COOH \cdot 4-6H_2O$

FAB: M^+ 1348,3

DC (Merck-Fertigplatten Kieselgel 60, n Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser 9,5:6:1:7,5) R_f 0,3

HPLC (Bedingungen siehe Beispiel 1): t_R 10,5 min,

Hauptpeak ≥ 69 Fl.-%

$[\alpha]_D^{20} = -84,3^\circ$ (C = 1,5%ige Essigsäure)

Aminosäureanalyse (6N HCl, 110°C, 20h): Arg 0,96 (1), Pro 2,10 (2), Lys 1,05 (1), Glu 2,14 (2), Phe 1,96 (2), Gly 1,00 (1), Leu 1,02 (1), Met 0,86 (1).

B: Die Säule wird unter Verwendung eines linearen Gradienten bestehend aus 1,5 l 0,1 M Essigsäure und 1,5 l 0,1 M Essigsäure/35% Acetonitril, eluiert. Die Ausbeute an l mit einer Reinheit (HPLC) von ≥ 97 Fl.-% beträgt 45%. Die analytischen Daten entsprechen den unter (A) genannten.