

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149112 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 3141/77

(51) Int.Cl.⁴: C 07 K 5/10
C 07 K 7/06

(22) Indleveringsdag: 11 jul 1977

(41) Alm. tilgængelig: 13 jan 1978

(44) Fremlagt: 27 jan 1986

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: 12 jul 1976 NL 7607684

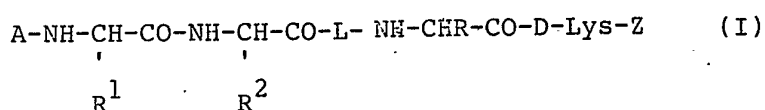
(71) Ansøger: *AKZO N.V.; Arnhem, NL.

(72) Opfinder: Hendrik Marie *Grevén; NL, David de *Wied; NL.

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af tetra-,
penta-, hexa- eller heptapeptider eller funk-
tionelle derivater deraf

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte tetra-, penta-, hexa- eller heptapeptider med den almene formel:



eller et funktionelt derivat deraf valgt blandt farmaceutisk acceptable syreadditionssalte og metalsalte, acylderivater afledt af en alifatisk carboxylsyre med 1 - 6 carbonatomer, usubstituerede amider eller C₁₋₆-alkylsubstituerede amider, estere afledt af alifatiske alkoholer med 1 - 18 carbonatomer samt metalkomplekser, hvori A betegner H-(L eller D)Met, H-(L eller D)Met(→ O), H-(L eller D)Met(→ O₂), desamino-Met, desamino-Met(→ O), desamino-Met(→ O₂) eller gruppen H₂N-B-CO-, B betegner en ligekædet eller forgrenet alkylengruppe (C₁-C₆) eller alkylidengruppe (C₁-C₆), R betegner en alkylgruppe (C₁-C₆) eller phenylmethyl, R¹ og R²

betegner hydrogen eller en alkylgruppe (C_1-C_6), og Z betegner



10 hvor ALK betegner en alkylengruppe med 1-6 carbonatomer, og R³ betegner hydrogen, halogen, hydroxy, en alkylgruppe med 1-4 carbonatomer eller en alkoxygruppe med 1-4 carbonatomer, eller L-Trp-OH, L-Phe-OH, L-Trp-Gly-OH eller L-Phe-Gly-OH.

15 Disse peptider og peptidderivater, som omtales i det følgende, har værdifulde psykofarmakologiske egenskaber. Navnlig inhiberer de ophævelsen af den betingede flugtreaktion, og som resultat heraf er de fortrinligt egnede til behandling af visse mentale forstyrrelser, ved hvilke stimulation af hjernefunktionen er ønskelig, såsom senilitet eller andre skrøbeligheder i den høje alder.

20 Fra Eur.J.Pharmacol.2, 14(1967) er det kendt, at visse peptidfragmenter af de naturlige adrenocorticotrope hormoner (ACTH) forsinker ophævelsen af den betingede flugtreaktion. Specielt peptidet bestående af aminosyresekvensen 4-10 af ACTH viste sig at være det mindste peptidfragment, som er aktivt i denne henseende.

25 Foruden de nævnte psykofarmakologiske egenskaber har peptidet med aminosyresekvensen 4-10 ACTH også en ringe MSH-(melanocytstimulerende hormon)-aktivitet, som er sædvanlig for denne type ACTH-fragmenter. Selvom virkningen af en lav dosis af peptidet med MSH-aktivitet stadig ikke kendes fuldstændigt, har en forskning ikke desto mindre været foretaget med henblik på peptider med i det mindste den samme psykofarmakologiske virkning, men uden nogen eller med meget reduceret MSH-aktivitet.

35 I USA patentskrift nr. 3.853.836 er det vist, at aminosyresekvensen 4-10 ACTH ikke er afgørende for psykofarmakologisk virkning, og at denne virkning skyldes et meget kortere peptid, nemlig 4-6 ACTH. Det fremgår endvidere, at den N-endestillede aminosyre L-Met uden tab af aktivitet kan udskiftes med D-Met, L- eller D-Met(→O), L- eller D-Met

($\rightarrow O_2$), desamino-Met, desamino-Met($\rightarrow O$) eller desamino-Met($\rightarrow O_2$), eller med gruppen $H_2N-B-C-$, hvori B betegner en ligekædet eller forgrenet



alkylengruppe med 1-6 carbonatomer.

5

I USA patentskrift nr. 3.856.770 er det endvidere vist, at udskiftning af den C-endestillede peptidrest -L-Trp-Gly-OH i det oprindelige 4-10 ACTH-peptid eller i de fra USA patentskrift nr. 3.853.836 kendte, modificerede peptider med en af grupperne -L-Phe-OH, L-Phe-Gly-OH, en phenylalkylaminogruppe eller en (3-indolyl)alkylaminogruppe, resulterer i en forøgelse af den psykofarmakologiske virkning.

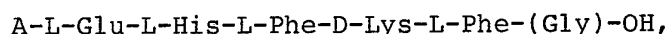
10

I USA patentskrift nr. 3.842.064, der svarer til DK patentans. nr. 1716/73, jvf. DK fremlæggelsesskrift nr. 145.665, er det yderligere vist, at en betydelig stigning i den psykofarmakologiske virkning opnås ved udskiftning af L-arginin⁸ med D-lysin i det oprindelige 4-10 ACTH-peptid eller i et af de modificerede peptider, som er beskrevet i de ovennævnte patentskrifter.

15

I det sidstnævnte patentskrift er de mest aktive peptider beskrevet, nemlig peptiderne med den almene formel:

20



hvori A har den ovenfor anførte betydning. Disse peptider viser sig at have en virkning, der er ca. 1000 gange kraftigere end virkningen af det oprindelige 4-10 ACTH.

25

Det har nu overraskende vist sig, at aminosyreresterne Glu og His, som indtil nu har været betragtet som afgørende for aktiviteten, uden væsentligt aktivitetstab for peptiderne kan udskiftes med lavere alifatiske aminosyrerester, såsom Ala, Leu, Val og Ile, som kan anvendes meget simplere og billigere end Glu og His ved peptidsyntesen.

30

Det har også vist sig, at aminosyren L-Phe i stillingen 7 i det oprindelige 4-10 ACTH kan erstattes af andre L-aminosyrer indbefattet de lavere alifatiske aminosyrer, som er omtalt ovenfor.

35

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

- 5 Virkningen af ifølge opfindelsen fremstillede peptider i forhold til beslægtede kendte forbindelser fremgår af nedenstående tabel I.

TABEL I.

10	Peptid	Virkningsevne *) i forhold til 4 - 9 ACTH (= 1).
	1. H-Met-Glu-His-Phe-D-Lys-Phe-OH	300
15	(referenceforbindelse)	
	2. H-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH	30-100
	(forbindelse fremstillet ifølge opfindelsen)	
	3. H-Met(O ₂)-Glu-His-Phe-D-Lys-Phe-OH	1.000
	(referenceforbindelse)	
20	4. H-Met(O ₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH	300-1.000
	(forbindelse fremstillet ifølge opfindelsen)	
	5. H-Met(O ₂)-Glu-His-Phe-D-Lys-Phe-OH	1.000
	(referenceforbindelse)	
	6. H-Met(O ₂)-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-OH	1.000
25	(forbindelse fremstillet ifølge opfindelsen)	

*) inhibering af ophævelsen af den betingede flugtreaktion, målt ved det velkendte stang-springforsøg.

- 30 De ifølge opfindelsen fremstillede peptider (2, 4 og 6) har i det væsentlige den samme psykofarmakologiske virkning som de nævnte beslægtede, kendte forbindelser, men kan syntetiseres meget lettere.

- 35 Grupperne, der betegnes som endestillede grupper ved definitionen af Z, nemlig N(phenylalkyl)-amino og N(β -indolylalkyl)amino, er grupper, der afviger fra de tilsvarende aminosyrerester ved fravær af carboxylgruppen.

Med N(phenylalkyl)amino- og N(β -indolylalkyl)-aminogrupper forstås grupperne henholdsvis



hvor Alk betegner en alkylengruppe med 1-6 carbonatomer, fortrinsvis ethyl, og R^3 betegner hydrogen, halogen, en hydroxygruppe, en alkylgruppe med 1-4 carbonatomer eller en alkoxygruppe med 1-4 carbonatomer.

Peptiderne og de funktionelle derivater deraf med den almene formel I fremstilles på måder, der er sædvanlige for sådanne forbindelser. De mest hyppigt benyttede metoder til fremstilling af peptiderne, som her er omtalt, kan opsummeres som følger:

- (a) kondensation, i nærværelse af et kondensationsmiddel, af en forbindelse (aminosyre, peptid) indeholdende en fri carboxylgruppe, og hvori andre reaktive grupper er blevet beskyttet, med en forbindelse (aminosyre, peptid eller amin) indeholdende en fri amino-
gruppe, og hvori andre reaktive grupper ligeledes er blevet beskyttet,
- (b) kondensation af en forbindelse (aminosyre, peptid) indeholdende en aktiveret carboxylgruppe, hvori de andre reaktive grupper eventuelt er blevet beskyttet, med en forbindelse (aminosyre, peptid, amin) indeholdende en fri aminogruppe, og hvori andre reaktive grupper er blevet beskyttet,

hvorefter de beskyttende grupper om ønsket kan fjernes.

Fremgangsmåder til aktivering af carboxylgruppen indbefatter omdannelse af denne gruppe til et syrehalogenid, et azid, et anhydrid, et imidazolid eller en aktiveret ester, såsom N-hydroxy-succinimidesteren eller p-nitrophenylesteren.

Aminogruppen kan aktiveres ved omdannelse af denne gruppe til et phosphitamid eller ved anvendelse af "phosphorazometoden".

De mest almindeligt benyttede metoder til udførelse af de ovennævnte kondensationsreaktioner er: Carbodiimidmetoden, azidmetoden, den blandede anhydrid-metode og den aktiverede ester-metode, der er beskrevet i "The Peptides", bind 1, 1965 (Academic Press), E.Schröder og K.Lübke. Den såkaldte "fastfasemetode" ifølge Merrifield, der er beskrevet i J.Am.Chem.Soc. 85, 2149 (1963), kan yderligere anvendes til fremstilling af peptiderne eller peptidderivaterne ifølge opfindelsen. De reaktive grupper, som skal hindres i at deltage i kondensationsreaktionen, beskyttes effektivt ved hjælp af såkaldte beskyttelsesgrupper, der let kan fjernes igen, f.eks. ved hjælp af hydrolyse eller reduktion. F.eks. kan en carboxylgruppe effektivt beskyttes ved esterifikation med methanol, ethanol, tert.-butanol, benzylalkohol eller p-nitrobenzylalkohol eller ved omdannelse til et amid. Denne sidstnævnte beskyttelsesgruppe er imidlertid meget vanskelig at fjerne, så at det anbefales, at denne gruppe kun benyttes til beskyttelse af carboxylgruppen i den C-endestillede aminosyre i det endelige peptid.

I dette tilfælde fører peptidsyntesen direkte til amidet af peptidet med formlen I.

Grupper, som effektivt kan beskytte en aminosyregruppe, er sædvanligvis syregrupper, f.eks. en syregruppe afledt af en alifatisk, aromatisk, aralifatisk eller heterocyklisk carboxylsyre, såsom acetyl-, benzoyl- eller pyridin-carboxylgruppe, eller en syregruppe afledt af kulsyre, såsom ethoxycarbonyl-, benzyloxycarbonyl-, t-butyloxycarbonyl- eller p-methoxybenzyloxycarbonylgruppen, eller en gruppe afledt af en sulfonsyre, såsom benzensulfonyl- eller p-toluensulfonylgruppen, men andre grupper, såsom substituerede eller usubstituerede aryl- eller aralkylgrupper, f.eks. benzyl- og triphenylmethylgruppen, eller grupper, såsom o-nitrophenylsulfenyl- og 2-benzoyl-1-methylvinylgruppen, kan også anvendes.

Det anbefales ofte, at ϵ -aminogruppen i lysin og eventuelt den phenoliske hydroxylgruppe i tyrosin også beskyttes. Denne sidstnævnte be-

skyttelse er imidlertid ikke altid vigtig. Sædvanlige beskyttelsesgrupper i denne sammenhæng er en tert.-butyloxycarbonylgruppe eller en tosylgruppe til ϵ -aminogruppen i lysin, og en benzylgruppe til den phenoliske hydroxylgruppe i tyrosin.

5 Beskyttelsesgrupperne kan fraspaltes ved hjælp af forskellige konventionelle metoder, afhængigt af naturen af den omhandlede gruppe, f.eks. ved hjælp af trifluoreddikesyre eller ved hjælp af mild reduktion, f.eks. med hydrogen og en katalysator, såsom palladium, eller med HBr i iseddikesyre.

10

Peptider fremstillet ifølge opfindelsen, som har (L eller D)Met(-O) eller desamino-Met(-O) som den N-endestillede rest, kan fremstilles ud fra det tilsvarende Met- eller desamino-Met-peptid ved hjælp af mild oxidation på kendt måde, f.eks. med fortyndet hydrogenperoxid eller en persyre.

15

En sådan oxidation resulterer i en blanding af S- og R-sulfoxiderne, der kan spaltes til opnåelse af de separate diastereo-isomere på i og for sig kendt måde, f.eks. ved hjælp af selektiv krystallisation. De separate diastereo-isomere kan også opnås direkte ved kobling af (L eller D)-methionin-S(eller R-)-sulfoxid eller det tilsvarende desamino-derivat deraf med resten af peptidfragmentet.

20

De ifølge opfindelsen fremstillede peptider, som har (L eller D)-Met($\rightarrow$ O₂) eller desamino-Met($\rightarrow$ O₂) som N-endestillet rest, kan opnås ved oxidation af (desamino)Met-peptidet I eller ved kobling af (desamino)Met-sulfon med resten af peptidfragmentet.

25

Med funktionelle derivater af peptiderne med den almene formel I forstås:

30

1. Farmaceutisk acceptable syreadditionssalte eller metalsalte, fortrinsvis alkalimetalsalte, såsom natriumsaltene,

35

2. peptidderivater med den almene formel I, hvori en eller flere frie aminogru-
pper er blevet substitueret med en acylgruppe, der er afledt af en alifatisk carboxylsyre med 1-6 carbonatomer, f.eks. acetyl, propionyl, butyryl, etc.,

3. amider, som eventuelt er C_1-C_6 -alkylsubstituerede, af peptiderne med den almene formel I, såsom de usubstituerede amider eller mono- eller di-alkyl (C_1-C_6)amider, f.eks. mono- eller dimethylamiderne,

5 4. estere af peptiderne med den almene formel I, der er afledt af alifatiske alkoholer med 1-18 carbonatomer, og

10 5. metalkomplekser dannet ved at peptiderne med den almene formel I bringes i kontakt med et i ringe grad opløseligt salt, hydroxid eller oxid af et metal, fortrinsvis zink.

Syreadditionssaltene opnås ved omsætning af peptiderne med den almene formel I med en farmaceutisk acceptabel syre, såsom et hydrogenhalogenid, phosphorsyre, eddikesyre, maleinsyre, vinsyre eller citronsyre.

15

Peptiderne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen og de ovenfor definerede derivater kan administreres såvel oralt som parenteralt. Peptiderne anvendes fortrinsvis som injektionspræparater, til hvilket formål de opløses, suspenderes eller emulgeres i et passende flydende medium. Hvis de blandes med passende excipienser eller fyldstoffer, kan de også oparbejdes til opnåelse af en form, der er egnet til oral administration, såsom piller, tabletter eller dragéer. Peptiderne med den almene formel I kan også administreres i form af en stikpille eller en spray.

25

Peptiderne eller peptidderivaterne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes fortrinsvis parenteralt i en daglig dosis på 0,01 μ g til 1 mg og oralt i en daglig dosis på 0,1 mg til 50 mg pr. kg legemsvægt, afhængigt af peptidets aktivitetsniveau.

30

Særligt værdifulde præparater opnås, når de omhandlede peptider oparbejdes til opnåelse af en form, hvori aktiviteten er forlænget. Der tænkes specielt på metalkomplekserne af peptiderne i denne sammenhæng. Metalkomplekserne kan opnås ved, at peptiderne bringes i kontakt med i ringe grad opløselige metalsalte, metalhydroxider eller metaloxider. Metalphosphater, metalpyrophosphaterne og metalpolyphosphaterne benyttes som svagt opløselige metalsalte.

35

Metaller, der kan anvendes hertil, er metallerne hørende til overgangsgrundstofferne, f.eks. kobolt, nikkel, kobber, jern og fortrinsvis zink, samt metaller hørende til det periodiske systems hovedgrupper, og som er i stand til at danne komplekser, såsom magnesium og aluminium. Fremstillingen af disse metalkomplekser foregår på den sædvanlige måde.

Et metalkompleks kan f.eks. opnås ved, at peptidet og et svagt opløseligt metalsalt, metalhydroxid eller metaloxid sættes til et vandigt medium. Metalkomplekset kan også opnås ved, at et alkalisk medium sættes til en vandig opløsning af peptidet og et opløseligt metalsalt, hvilket resulterer i, at det uopløselige peptid-metalhydroxidkompleks dannes.

Metalkomplekset kan yderligere opnås ved, at peptidet, et opløseligt metalsalt og et yderligere opløseligt salt sættes til et vandigt, fortrinsvis alkalisk medium, hvilket resulterer i, at et uopløseligt peptid-metalsaltkompleks dannes in situ.

Metalkomplekserne kan anvendes umiddelbart som suspensioner, eller de kan f.eks. frysetørres og senere resuspenderes.

Definitionen af A indbefatter resterne Met, desamino-Met, det tilsvarende sulfoxid og den tilsvarende sulfon af Met og desamino-Met, men også aminosyreresten $H_2N-B-CO$, hvori B er en forgrenet eller uforgrenet alkylen- eller alkylidendel med 1-6 carbonatomer og fortrinsvis med 1-5 carbonatomer. Den sidstnævnte aminosyrerest indbefatter fortrinsvis de naturlige α -aminosyrerester Gly, Ala, Val, Leu og Ile, men kan også indbefatte andre rester, såsom β -Ala eller $(\alpha-Me)Ala$.

Aminosyreresterne $HN-CHR^1-CO$ og $HN-CHR^2-CO$ i peptiderne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen betegner den samme eller forskellige alifatiske α -aminosyrerester. Foretrukne aminosyrerester i denne sammenhæng er sådanne, hvori R^1 og R^2 betegner hydrogen eller alkyl (C_1-C_4) og især de naturlige aminosyrerester Gly, Val, Leu, Ile og især Ala.

α -aminosyreresten Q, der defineres som $HN-CHR-CO$, i peptiderne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter de naturlige amino-

syre Ala, Val, Leu, Ile, Tyr, Trp og Phe. Aminosyreresterne Phe, Leu og sådanne rester, hvori R betegner en lavere alkylgruppe (C_1-C_4), især Ala ($R = CH_3$), foretrækkes.

- 5 Estere af peptiderne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er fortrinsvis afledt af alkanoler med 1 til 8 carbonatomer, især med 1 til 4 carbonatomer, såsom methanol, ethanol, propanol og butanol, og de kan fremstilles ved esterifikation af det endelige peptid eller ved esterifikation af den pågældende udgangsaminosyre, hvorved ester-
- 10 delen kan fungere som beskyttelsesgruppe under peptidsyntesen.

Amider fremstilles på en lignende måde ved enten aminolyse af den endelige ester eller ved at begynde peptidsyntesen ud fra amidet af den pågældende aminosyre.

- 15 Foretrukne peptider med den almene formel I er de peptider, hvori R^1 og R^2 betegner identiske grupper, f.eks. methyl (resulterende i aminosyreresten Ala), isopropyl (resulterende i aminosyreresten Val), eller 2-methylpropyl (resulterende i aminosyreresten Leu).

- 20 "A" i den almene formel I er fortrinsvis L-Met eller desamino-Met, eller sulfoxiderne eller sulfonerne, som afledes af disse to syrerester.

- 25 Symbolet "Q" betegner fortrinsvis en af syreresterne L-Phe eller L-Ala.

- 30 Symbolet "Z" i den almene formel I er fortrinsvis aminosyreresten L-Phe-OH eller eventuelt peptidresten L-Phe-Gly-OH, selvom denne sidstnævnte mulighed repræsenterer en forøget kædelængde uden nogen yderligere aktivitetsforøgelse.

Af de ifølge opfindelsen fremstillede foretrækkes navnlig følgende peptider:

H-L-Met-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-OH ,
 H-L-Met(O)-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-OH ,
 H-L-Met(O₂)-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-OH ,
 H-L-Met-L-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Lys-L-Phe-Gly-OH ,
 5 H-L-Met(O)-L-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Lys-L-Phe-Gly-OH ,
 H-L-Met(O₂)-L-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Lys-L-Phe-OH ,
 desamino-Met-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-OH ,
 desamino-Met(O₂)-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-OH ,
 desamino-Met (O)-L-Ala-L-Ala-L-Phe-D-Lys-L-Phe-Gly-OH.

10

De nedenfor anførte oplysninger gives i relation til de efterfølgende eksempler.

15

I. Hvis ingen optisk konfiguration er anført, er der tale om L-formen.

II. De følgende forkortelser er blevet anvendt for de benyttede beskyttelsesgrupper og aktiverende grupper:

20

Boc	=	tert.-butyloxycarbonyl
tBu	=	tert.-butyl
Me	=	methyl
ONP	=	p-nitrophenyloxy
Bzl	=	benzyl
25 ONB	=	nitrobenzyloxy
OSu	=	succinimido-N-oxy
Z	=	benzyloxycarbonyl.

III. De følgende forkortelser er blevet anvendt for de benyttede opløsningsmidler eller reagenser:

30

Bz	=	benzen
To	=	toluen
EtOH	=	ethanol
35 Bu	=	butanol
Py	=	pyridin
Ac	=	eddikesyre
EtOAc	=	ethylacetat
Fo	=	myresyre
40 Am	=	amylalkohol
iPro	=	isopropanol
DMF	=	dimethylformamid

	THF	=	tetrahydrofuran
	DCCI	=	dicyclohexylcarbodiimid
	DCHU	=	dicyclohexylurinstof
	TAA	=	triethylamin
5	TFA	=	trifluoreddikesyre
	Wa	=	vand
	NEM	=	N-ethylmorpholin
	HOBt	=	N-hydroxybenztriazol

10 IV. De følgende forkortelser er blevet anvendt for aminosyregrupperne:

	Met	=	methionyl
	Met($\rightarrow$ O)	=	sulfoxid af methionyl
	Met($\rightarrow$ O ₂)	=	sulfon af methionyl
15	Phe	=	phenylalanyl
	Tyr	=	tyrosyl
	Lys	=	lysyl
	Trp	=	tryptophyl
	Gly	=	glycyl
20	Val	=	valyl
	Leu	=	leucyl
	Ala	=	alanyl
	Ile	=	isoleucyl
	β -Ala	=	β -alanyl
25	(α -Me)Ala	=	α -methylalanyl.

V. De følgende forkortelser er blevet anvendt for grupper beslægtet med aminosyrerester:

30	PPA	=	N-(3-phenylpropyl)amino
	PEA	=	N-(2-phenylethyl)amino
	HPEA	=	N-(p-hydroxyphenylethyl)amino
	Amf	=	N-(2-phenylisopropyl)amino, afledt af amphetamin
35	Tra	=	N-(β -indolylethyl)amino, afledt af tryptamin
	Desamino-Met	=	desamino-methionyl
	Desamino-Met($\rightarrow$ O)	=	sulfoxid af desamino-methionyl (eller 4-methylsulfinylbutyryl)
40	Desamino-Met($\rightarrow$ O ₂)	=	sulfon af desamino-methionyl (eller 4-methylsulfonylbutyryl).

Fremstilling af udgangsmaterialer.I. N-endestillet del1. Boc-Met-Ala-Ala-N₂H₃

(a) Boc-Ala-Ala-OMe: 20,79 g Boc-Ala-OH opløses i 150 ml DMF. Efter køling til -10°C tilsættes 15,84 ml TAA efterfulgt af 10,45 ml ethylchlorformiat. Det hele omrøres i 10 minutter ved -10°C, hvorefter en opløsning af 13,9 g H-Ala-OMe.HCl i 150 ml DMF og 14,4 ml TAA sættes til reaktionsblandingen, og det hele omrøres i yderligere 15 minutter ved -10°C, i 2 timer ved 0°C og til slut i 8 timer ved stuetemperatur. Efter køling til -10°C frafiltreres TAA.HCl, og filtratet inddampes til tørhed. Resten opløses i 250 ml ethylacetat og vaskes i rækkefølge med vand, HCl (0,05N), K₂CO₃-opløsning (5%) og NaCl-opløsning (30%). Efter tørring over Na₂SO₄ inddampes filtratet til tørhed, og resten krystalliseres fra ether/petroleumsether. Udbytte 19,3 g med smeltepunkt 108/110°C, Rf i To:EtOH (8:2) = 0,50 på SiO₂.

(b) H-Ala-Ala-OMe.HCl: 18,75 g Boc-Ala-Ala-Ome (fra (a)) opløstes i 150 ml methylenchlorid, og HCl føres ind i opløsningen i 45 minutter under konstant køling i isvand. Udbytte af afbeskyttet produkt = 14,3 g. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,01 på SiO₂.

(c) Boc-Met-Ala-Ala-OMe: 15,8 g Boc-Met-N₂H₃, som er opløst i 150 ml DMF, aktiveres ved -20°C med 28,0 ml 4,2N HCl i THF og 8,10 ml isoamylnitrit. Efter aktivering i 20 minutter ved -15°C neutraliseres opløsningen med 14,5 ml NEM, hvorefter en opløsning af 14,3 g H-Ala-Ala-OMe.HCl (fra (b)) i 75 ml DMF og 1 ækvivalent NEM tilsættes. Efter at pH-værdien er blevet indstillet til 7,2 med NEM, holdes reaktionsblandingen i 48 timer ved ca. 4°C. Efter 48 timer frafiltreres NEM.HCl-mængden, og filtratet inddampes til tørhed. Resten opløses i 300 ml ethylacetat, hvorefter den vaskes med vand, 0,05N HCl, 5% NaHCO₃ og atter med vand.

Efter tørring over Na₂SO₄ inddampes filtratet til tørhed, og resten krystalliseres fra ethylacetat/petroleumsether (1:1). Udbytte 16,2 g med smeltepunkt 128-129°C. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,46 på SiO₂.

(d) Boc-Met-Ala-Ala-N₂H₃: 15,9 g Boc-Met-Ala-Ala-OMe (fra (c)) op-

løses i 160 ml methanol, og 16,0 ml hydrazinhydrat tilsættes. Efter omrøring i 3 1/2 time tilsættes 200 ml tør ether. Efter køling til 0°C frafiltreres det faste materiale. Udbytte 12,6 g med smeltepunkt 207-208°C. Rf i Am:iPro:Wa (10:4:5) = 0,41 på SiO₂.

5

De følgende peptider fremstilles på en måde, som er analog med den i I.1 anførte:

10

2. Boc-Ala-Ala-Ala-N₂H₃,
Rf i Am:iPro:Wa (10:4:5) = 0,44

3. Boc-Val-Ala-Ala-N₂H₃,
Rf i Am:iPro:Wa (10:4:5) = 0,40

4. Boc-Ala-Leu-Leu-N₂H₃,
Rf i Am:iPro:Wa (10:4:5) = 0,38

15

5. Boc-Met-Ala-Leu-N₂H₃,
Rf i Am:iPro:Wa (10:4:5) = 0,39

6. Boc-Met-Val-Val-N₂H₃,
Rf i Am:iPro:Wa (10:4:5) = 0,38

20

7. Boc-Met(O₂)-Ala-Ala-N₂H₃,
Rf i Am:iPro:Wa (10:4:5) = 0,30

8. Desamino-Met-Ala-Ala-N₂H₃,
Rf i Am:iPro:Wa (10:4:5) = 0,34

9. Desamino-Met(O₂)-Ala-Ala-N₂H₃,
Rf i Am:iPro:Wa (10:4:5) = 0,23

25

II C-endestillet del.

1. Syntese af H-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

(1) Z-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

30

10,03 g Z-D-Lys(Boc)-ONP opløses i 50 ml DMF, og opløsningen sættes efter køling til -20°C til en opløsning af 4,1 g H-Phe-OtBu i 75 ml DMF. Efter omrøring i 1 time ved 0°C og i yderligere 20 timer ved 20°C indampes reaktionsblandingen til tørhed. Den gule rest opløses i ethylacetat-vand og vaskes med 5% kaliumcarbonat, vand, 5% citronsyre og atter med vand. Den organiske fase tørres og indampes til tørhed. Resten opløses i ethylacetat, og petroleumsether (40-60) tilsættes, indtil opløsningen bliver uklar. Det resulterende præcipitat frafiltreres derpå. Rf i To:EtOH (9:1) = 0,63 (SiO₂).

35

(2) H-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

3 g af dipeptidet fra (1) opløses i 60 ml methanol. Efter tilsætning af 10% palladium på trækul tilledes hydrogen, indtil udviklingen af CO₂ op-
hører (2 timer). Efter filtrering over "hyflo[®]" inddampes filtratet
til tørhed, hvilket resulterer i et skum. Rf i To:EtOH (9:1) = 0,21 (SiO₂).

(3) Z-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

2,18 g Z-Phe-ONP opløses i 15 ml DMF. Efter tilsætning af en opløsning af 2,24 g H-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu (fra 2) i 30 ml DMF omrøres det hele i 15 minutter ved 20°C.

Efter indampning af den gule opløsning til tørhed opløses resten i 15 ml ethylacetat, hvorefter 50 ml petroleumsether tilsættes. Man lader derefter blandingen henstå i 8 timer ved 0°C, hvorefter det dannede præcipitat frafiltreres. Smeltepunkt 135-138°C.

(4) H-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

2,5 g af det i (3) opnåede tripeptid hydrogeneres på den i (2) beskrevne måde. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,38 (SiO₂).

2. H-Leu-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

(1) Z-Leu-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

Z-Leu-ONP (3,2 g) opløses i 40 ml DMF. 3,6 g H-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu sættes derefter til opløsningen, hvorefter blandingen omrøres i 20 timer ved stuetemperatur. Efter indampning af reaktionsblandingen til tørhed opløses resten i 100 ml ethylacetat, og den resulterende opløsning vaskes med 10% K₂CO₃-opløsning, 30% NaCl-opløsning, 5% citronsyreopløsning og atter med 30% NaCl-opløsning. Ethylacetatopløsningen tørres derefter, og dens volumen reduceres ved indampning, hvorefter petroleumsether sættes til koncentratet. Det dannede præcipitat frafiltreres. Smeltepunkt 102-105°C, Udbytte 4,8 g.

(2) H-Leu-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

Det i (1) opnåede tripeptid hydrogeneres med Pd/C (10%) som katalysa-

5 tor på den i II.1.2. beskrevne måde. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,41 på SiO₂.

3. H-Ala-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu

10 2,8 g Z-Ala-ONP kobles til 3,6 g H-D-Lys(Boc)-Phe-OtBu på en måde, der er analog med den i 2 beskrevne, og det resulterende beskyttede tripeptid hydrogeneres derefter. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,37 på SiO₂.

4. H-Leu-D-Lys(Boc)-Tra

15 1. Z-Leu-D-Lys(Boc)-Tra

20 Z-Leu-D-Lys(Boc)Tra opnås på den måde, som er beskrevet i II.1.3, idet man går ud fra 3,1 g Z-Leu-ONP og 3 g H-D-Lys(Boc)-Tra (fremstillet ud fra Z-D-Lys(Boc)-Tra. Udbytte 65%; Rf i To:EtOH (8:2) = 0,72 på SiO₂.

2. H-Leu-D-Lys(Boc)-Tra

25 2 g af peptidet (fra 1) opløses i 25 ml methanol og hydrogeneres i nærværelse af 10% palladium på trækul på den i II.1.2 beskrevne måde. Inddampning til tørhed resulterer i et skum. Udbytte 95%; Rf i To:EtOH (8:2) = 0,47 (SiO₂).

5. H-Phe-D-Lys(Boc)-Tra

30 Analogt med 4. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,33.

6. H-Ala-D-Lys(Boc)-Tra

35 Analogt med 4. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,35.

7. H-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OMe; H-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OH

1. Z-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OMe

40 5,57 g Z-Leu-OH opløses i 50 ml DMF, og efter køling af opløsningen

til 0°C tilsættes 3,0 ml TAA og 2,0 ml ethylchlorformiat. Reaktionsblandingens omrøres i 15 minutter, hvorefter 8,64 g H-D-Lys(Boc)-Trp-OMe i 50 ml DMF tilsættes ved -10°C, og blandingen omrøres ved denne temperatur i 30 minutter. Efter omrøring i yderligere 2 timer ved 0°C og derpå i ca. 5 timer ved stuetemperatur filtreres blandingen, og filtratet indampes til tørhed. Resten opløses derefter i ethylacetat, og den resulterende opløsning vaskes i rækkefølge med vand, 5% NaHCO₃-opløsning, vand, 0,1N HCl og 30% NaCl-opløsning. Opløsningen tørres derefter og indampes til tørhed (olie). Rf i To:EtOH (9:1) = 0,41 på SiO₂. Udbytte 10,5 g.

2. Z-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OH

Tripeptidesteren fra 1. (5 g) opløses i 100 ml dioxan, hvorefter 15,3 ml 0,94N NaOH tilsættes. Reaktionsblandingens omrøres i 2 timer ved stuetemperatur og syrnes derpå til pH 7 med 2N HCl. Dioxanet fjernes derefter ved indampning, og ethylacetat/vand sættes til resten. Blandingens (det vandige lag) syrnes derpå (pH 2) uden separering af lagene. Den organiske fase vaskes med 10% NaCl-opløsning og tørres derefter. Fjernelse af opløsningsmidlet ved destillation resulterer i et skum. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,38 på SiO₂. Udbytte 3,8 g.

3. H-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OH

3,15 g af det i 2 opnåede tripeptid opløses i 50 ml DMF og 1,67 ml 4N HCl. 50 mg Pd/C (10%) sættes derefter til opløsningen, og hydrogen gennemledes i 4 timer. Katalysatoren filtreres derefter fra, og filtratet indampes til tørhed (olie). Rf i To:EtOH (9:1) = 0,10 på SiO₂.

4. H-Leu-D-Lys(Boc)-Trp-OMe

Peptidesteren fra 1 hydrogeneres på en måde, der er analog med den i 3. beskrevet, hvilket resulterer i en olie. Rf i Am:Py:Wa (5:3:2) = 0,29 på SiO₂.

8. Fremstilling af H-Leu-D-Lys(Boc)-phenylalkylamider

1. Z-D-Lys(Boc)-PPA

10,33 g (20,6 mmol) Z-D-Lys(Boc)-ONP opløses i 80 ml methylenchlorid

ved ca. 0°C . 2,7 g 3-phenylpropylamin sættes derefter til denne opløsning, hvorpå blandingen omrøres i 1 1/2 time ved 0°C og i yderligere 18 timer ved stuetemperatur. Opløsningsmidlet fjernes ved inddampning, og resten opløses i 200 ml ethylacetat. Ethylacetatopløsningen vaskes derpå i rækkefølge med natriumcarbonatopløsning (10%), NaCl-opløsning (30%), 0,1N HCl og en 30% NaCl-opløsning, hvorefter ethylacetatlaget tørres og inddampes til et volumen på ca. 80 ml. En tilstrækkelig ethermængde til frembringelse af uklarhed tilsættes derpå, og blandingen anbringes i et køleskab. Det dannede præcipitat filtreres fra efter 2 timer. Rf i Bz:EtOH (9:1) = 0,50 på SiO_2 .

2. H-D-Lys(Boc)-PPA

8,75 g af den i 1. opnåede forbindelse opløses i 120 ml methanol, hvortil 1,2 g 10% palladium-trækul er blevet tilsat. Derefter gennemledes hydrogen under omrøring i 3,5 timer, hvorefter katalysatoren filtreres fra. Inddampning af filtratet til tørhed resulterer i en næsten farveløs olie, der øjeblikkelig anvendes til yderligere reaktioner. Rf i Am:Fo:WA (7:2:1) = 0,54 på SiO_2 .

3. Z-Leu-D-Lys(Boc)-PPA

6,39 g af det i 2 opnåede beskyttede aminosyrederivat opløses i 68 ml dimethylformamid, og en opløsning af 7,0 g Z-Leu-ONP i 20 ml dimethylformamid tilsættes. Blandingens omrøres ved stuetemperatur i 20 timer, hvorefter opløsningsmidlet fjernes ved inddampning under vakuum. Resten opløses i 170 ml ethylacetat og vaskes i rækkefølge med 5% kaliumcarbonatopløsning, 30% NaCl-opløsning, 0,1N HCl og 30% NaCl-opløsning. Ethylacetatlaget tørres derefter over Na_2SO_4 og inddampes til tørhed. Rf i Bz:EtOH (8:2) = 0,64 på SiO_2 .

4. H-Leu-D-Lys(Boc)-PPA

9,0 g af det i 3. opnåede peptidderivat opløses i 300 ml dimethylformamid, hvortil 4 ml 4N HCl og 1,5 g 10% palladium-trækul er blevet tilsat. Hydrogen gennemledes derefter i 3 1/2 timer under omrøring, hvorefter katalysatoren filtreres fra, og filtratet inddampes til tørhed, hvilket resulterer i en næsten farveløs olie. Rf i Bu:Ac:WA (4:1:1) = 0,55 på SiO_2 .

5. Følgende fremstilles på tilsvarende måde:

1. H-Leu-D-Lys(Boc)-L-Amf,

5 Rf i To:EtOH (8:2) = 0,50 på SiO₂.

2. H-Leu-D-Lys(Boc)-PEA,

Rf i To:EtOH (8:2) = 0,42 på SiO₂.

3. H-Leu-D-Lys(Boc)-HPEA,

Rf i To:EtOH (8:2) = 0,34 på SiO₂.

10

9. Syntese af H-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH

(a) Z-Phe-D-Lys(Boc)-OMe: 29,9 g Z-Phe-OH og 14,8 g HOBt opløses i 200 ml DMF. Efter køling til -22°C tilsættes følgende i rækkefølge: En opløsning af 32,6 g H-D-Lys(Boc)-OMe.HCl i 210 ml DMF og et ækvivalent TAA, og en opløsning af 22,7 g DCCI i 100 ml DMF. Det hele omrøres derefter i 15 minutter ved -22°C, i 2 timer ved 0°C og i ca. 16 timer ved stuetemperatur.

15

20

Efter køling frafiltreres det dannede DCHU, og filtratet inddampes til tørhed. Resten opløses i ethylacetat og vaskes med vand, 5% citronsyre, 5% natriumbicarbonat og atter med vand, hvorefter opløsningen inddampes til tørhed og krystalliseres. Udbytte 51,6 g med smeltepunkt 122-123°C.

25

(b) Z-Phe-D-Lys(Boc)-OH: 13,7 g Z-Phe-D-Lys(Boc)-OMe fra (a) opløses i 180 ml dioxan/H₂O (9:1), og 15 ml 2N NaOH tilsættes. Det hele omrøres derefter i 2 timer ved stuetemperatur, hvorefter reaktionsblandingen pH-værdi indstilles til 7 med 1 N HCl. Reaktionsblandingen volumen formindskes derefter til ca. 50 ml (dioxanfri) og 250 ml ethylacetat tilsættes. Blandingen vaskes med vand og tørres over Na₂SO₄. Na₂SO₄-mængden filtreres fra, og filtratet inddampes til tørhed. Resten krystalliseres fra ether/petroleumsether (1:2). Udbytte: 11,3 g med smeltepunkt 72/75°C. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,12 på SiO₂, og i Am:Py:Wa (5:3:2) = 0,69 på SiO₂.

30

35

(c) Boc-Phe-Gly-OBzl: Et ækvivalent NEM, efterfulgt af en opløsning af 25,5 g Boc-Phe-ONP i 100 ml DMF, sættes til en opløsning af 12,6 g H-Gly-OBzl.HCl i 100 ml DMF. Efter omrøring natten over ved stuetemperatur inddampes reaktionsblandingen til tørhed. Resten opløses i 300 ml ethylacetat/vand (5:1) og vaskes med vand.

40

Efter tørring over Na_2SO_4 indampes filtratet til et volumen på ca. 100 ml, hvorefter 50 ml petroleumsether og 250 ml tør ether tilsættes. Udbytte 16,7 g med smeltepunkt $126-127^\circ\text{C}$. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,56

5

- (d) H-Phe-Gly-OBzl.HCl: 8,25 g Boc-Phe-Gly-OBzl opløses i 120 ml methylenchlorid, og HCl-gas ledes ind i opløsningen under omrøring og køling (is/vand) i en time.

10

Efter 1 time standses tilledningen af HCl, og reaktionsblandingen indampes til tørhed. Udbytte: 6,9 g af et skumlignende produkt; Rf i To:EtOH (8:2) = 0,33 på SiO_2 .

15

- (e) Z-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OBzl: Metoden er analog med metoden beskrevet i (a). De nødvendige reagenser er: 9,25 g Z-Phe-D-Lys(Boc)-OH (fra (b)), 2,92 g HOBt, 6,98 g H-Phe-Gly-OBzl.HCl og 4,12 g DCCI.

20

Krystallisation fra ethylacetat/petroleumsether. Udbytte 12,0 g med smeltepunkt $157-159^\circ\text{C}$. Rf i To:EtOH (8:2) = 0,39 på SiO_2 .

25

- (f) H-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH: 4,11 g Z-Phe-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OBzl opløses i 75 ml DMF. Efter tilsætning af Pd/C tilledes hydrogen i 3 timer. Katalysatoren filtreres fra over "hyflo[®]/asbest, og filtratet indampes til tørhed. Udbytte 2,9 g. Rf i Bu:Py:Ac:Wa (4:0,75:0,25:1) = 0,46 på SiO_2 .

De følgende peptider fremstilles på en måde, som er analog med den i de foregående eksempler beskrevne:

30

10. H-Leu-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH,

Rf i Bu:Py:Ac:Wa (4:0,75:0,25:1) = 0,40 på SiO_2

35

11. H-Val-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH,

Rf i Bu:Py:Ac:Wa (4:0,75:0,25:1) = 0,42 på SiO_2

12. H-Ala-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH,

Rf i Bu:Py:Ac:Wa (4:0,75:0,25:1) = 0,37 på SiO_2

Eksempel IH-Met-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-Gly-OH

5 (a) Boc-Met-Ala-Ala-Ala-D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH (I.1. + II.14).

1,62 g Boc-Met-Ala-Ala-N₂H₃ opløses i 20 ml DMF. Efter køling til
 -20°C tilsættes 1,68 ml 4,74N HCl/THF efterfulgt af 0,60 ml iso=
 amylnitrit, og det hele omrøres i 20 minutter ved -15°C, hvorefter
 10 0,6 ml NEM tilsættes efterfulgt af en opløsning af 2,3 g H-Ala-
 D-Lys(Boc)-Phe-Gly-OH i 20 ml DMF, og 1,68 ml 4,74N HCl/THF. Reak-
 tionsblandingsens pH-værdi indstilles til 7,2 med NEM, hvorefter
 reaktionsblandingen holdes ved ca. 4°C i 2 dage. NEM.HCl-mængden
 15 frafiltreres derefter, og filtratet inddampes til tørhed. Resten
 opløses i 125 ml sec.butanol/CHCl₃ (2:3) og 25 ml H₂O, og den
 resulterende opløsning vaskes i rækkefølge med vand, 5% citronsyre-
 opløsning og atter med vand. Efter tørring over Na₂SO₄ inddampes
 filtratet til tørhed. Resten opløses i 40 ml methanol, hvortil
 160 ml vand derpå tilsættes, hvorpå det faste materiale filtreres
 20 fra og tørres. Udbytte 2,6 g; Rf i Bu:Py:Ac:Wa (4:0,70:0,25:1) =
 0,62 på SiO₂; smeltepunkt 202-203°C (dekomponering).

(b) H-Met-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-Gly-OH.acetat

25 2,6 g af det i a. opnåede peptid opløses i 26 ml 90% TFA. Efter
 omrøring i 45 minutter ved stuetemperatur under en nitrogenatmos-
 fære sættes opløsningen dråbevis til 250 ml tør ether. Det dannede
 præcipitat filtreres fra og tørres, hvorefter det faste materiale
 opløses i 40 ml tert.butanol/vand (1:1), og den resulterende op-
 30 løsnings omrøres med en ionbytterharpiks i acetatform. Efter omrø-
 ring i 30 minutter filtreres ionbytterharpiksen fra, og filtratet
 inddampes til tørhed. Resten underkastes rensning ved hjælp af
 modstrømsfordelingen. Udbytte 78%. Rf i Bu:Py:Ac:Wa (4:0,75:0,25:1)
 = 0,25 på SiO₂.

Eksempel II

De efterfølgende peptider fremstilles i form af acetatsaltene på en
 måde, der svarer til den i eksempel I beskrevne:

40 1. H-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.1 + II.10)

Rf = 0,24

2. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.1 + II.12)

Rf = 0,22

3. H-Met-Ala-Ala-Val-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.1 + II.13)

Rf = 0,18

5

4. H-Ala-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.2 + II.10)

Rf = 0,21

5. H-Val-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.3 + II.10)

10

Rf = 0,26

6. H-Ala-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.2 + II.14)

Rf = 0,20

7. H-Ala-Leu-Leu-Leu-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.4 + II.12)

Rf = 0,19

15

8. H-Met-Ala-Leu-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.5 + II.10)

Rf = 0,18

9. H-Met-Val-Val-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.6 + II.10)

Rf = 0,22

10. H-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.7 + II.10)

20

Rf = 0,16

11. desamino-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.8 + II.10)

Rf = 0,36

12. desamino-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH (I.9 + II.10)

Rf = 0,28

25

Eksempel III

Følgende peptider fremstilles som acetatsaltene på en måde svarende til den i eksempel I beskrevet:

30

1. H-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH (I.1 + II.1)

Rf = 0,27

2. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Phe-OH (I.1 + II.2)

Rf = 0,28

35

3. H-Met(O₂)-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-OH (I.7 + II.3)

Rf = 0,18

4. H-Met(O₂)-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Tra (I.7 + II.4)

Rf = 0,11

5. desamino-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Tra (I.8 + II.5)

Rf = 0,14

6. desamino-Met(O₂)-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Tra (I.9 + II.6)
Rf = 0,18
- 5 7. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Trp-OMe (I.1 + II.8)
Rf = 0,31
8. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Trp-OH (I.1 + II.8.3)
Rf = 0,18
- 9 . H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-PPA (I.1 + II.9.4)
10 Rf = 0,22
10. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-L-Amf (I.1 + II.9.5.1)
Rf = 0,24
11. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-PEA (I.1 + II.9.5.2)
Rf = 0,21
- 15 12. H-Met-Ala-Ala-Leu-D-Lys-HPEA (I.1 + II.9.5.3)
Rf = 0,26
13. H-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH (I.7 + II.1)
Rf = 0,19
14. H-Ala-Leu-Leu-Phe-D-Lys-Phe-OH (I.4 + II.1)
20 Rf = 0,32
15. desamino-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH (I.8 + II.1)
Rf = 0,35

25 Medmindre andet er anført, gælder Rf-værdierne, der er anført i eksemplerne II og III, for elueringsmidlet Bu:Py:Ac:Wa (4:0,75:0,25:1) på SiO₂.

Eksempel IV

30 Sulfoxider

0,06 mmol af peptidet opløses i 5 ml eddikesyre, og 15 µl 30% hydrogenperoxid sættes til opløsningen, som derpå omrøres i en time ved stuetemperatur. En suspension af 20 mg platinsort i 2,5 ml iseddikesyre tilsættes derefter. Blandingen omrøres i 15 minutter, hvorefter den filtreres. Filtratet indampes til tørhed under vakuum, og resten sættes til 10 ml tert.-butanol/vand. Blandingen lyofiliseres derefter. Acetaterne af følgende peptider fremstilles på denne måde:

- 40 1. H-Met(O)-Ala-Ala-Ala-D-Lys-Phe-Gly-OH
Rf = 0,12
2. H-Met(O)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH
Rf = 0,10

3. H-Met(O)-Ala-Leu-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH
Rf = 0,11
4. desamino-Met(O)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH
Rf = 0,26
- 5 5. H-Met(O)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH
Rf = 0,13
6. desamino-Met(O)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Tra
Rf = 0,15
7. H-Met(O)-Ala-Ala-Leu-D-Lys-PPA
Rf = 0,08
- 10 8. desamino-Met(O)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH
Rf = 0,19
9. H-Met(O)-Ala-Ala-Leu-D-Lys-Trp-OMe
Rf = 0,21

15

De anførte Rf-værdier gælder for Bu:Py:Ac:Wa (4:0,75:0,25:1) på SiO₂.

Eksempel V

20

Sulfoner.

0,2 mmol af peptidet opløses i en blanding af 0,5 ml vand, 0,1 ml 4N perchlorsyre og 0,2 ml 0,5M ammoniummolybdat, hvorefter 0,06 ml 30% hydrogenperoxid sættes til denne blanding. Blandingen omrøres i 2 timer ved en temperatur på ca. 10°C, hvorefter den fortyndes med 25 ml tert.-butanol/vand. En ionbytterharpiks ("Dowex"X-8 i acetatform) sættes derefter til blandingen, som omrøres i 30 minutter. Derefter filtreres blandingen, og filtratet lyofiliseres. Følgende acetater fremstilles på denne måde:

30

1. H-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-Gly-OH
Rf = 0,18
2. H-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH
Rf = 0,20
- 35 3. desamino-Met(O₂)-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH
Rf = 0,23

De anførte Rf-værdier gælder for Bu:Py:Ac:Wa (4:0,75:0,25:1) på SiO₂.

40

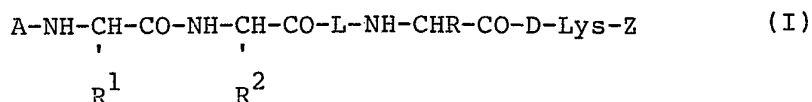
Eksempel VIZinkkomplekser

1,5 ml af en opløsning af zinkchlorid indeholdende 50 mg zink pr. ml, sættes til en opløsning af 31,5 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 30 ml destilleret vand. Præcipitatet i form af det således dannede zinkphosphat genopløses ved tilsætning af 4N HCl, hvorefter 175 mg NaCl og 0,5 g benzylalkohol sættes til blandingen. 1,5 mg af hexapeptidet H-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lys-Phe-OH (eksempel III.1) opløses derpå i denne blanding, og en tilstrækkelig mængde 1N natriumhydroxid tilsættes derefter til indstilling af blandingens pH-værdi til 8,5. Volumenet bringes derpå op på 50 ml med destilleret vand. 1 ml suspension indeholder:

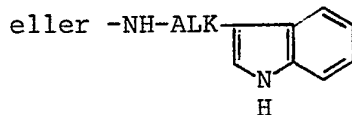
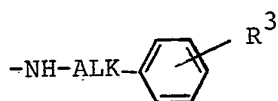
30 µg hexapeptid
 1,5 mg zink
 0,63 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 3,5 mg NaCl
 10 mg benzylalkohol

P a t e n t k r a v .

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af et tetra-, penta-, hexa- eller heptapeptid med den almene formel:



eller et funktionelt derivat deraf valgt blandt farmaceutisk acceptable syreadditionssalte og metallsalte, acylderivater afledt af en alifatisk carboxylsyre med 1 - 6 carbonatomer, usubstituerede amider eller C_1 - C_6 -alkylsubstituerede amider, estere afledt af alifatiske alkoholer med 1 - 18 carbonatomer samt metalkomplekser, hvori A betegner H-(L eller D)Met, H(L eller D)Met($\rightarrow$ O), H-(L eller D)Met($\rightarrow$ O₂), desamino-Met, desamino-Met($\rightarrow$ O), desamino-Met($\rightarrow$ O₂) eller gruppen $\text{H}_2\text{N-B-CO-}$, B betegner en ligekædet eller forgrenet alkylengruppe (C_1 - C_6) eller alkylidengruppe (C_1 - C_6), R betegner en alkylgruppe (C_1 - C_6) eller phenylmethyl, R^1 og R^2 betegner hydrogen eller en alkylgruppe (C_1 - C_6), og Z betegner



- 5 hvor ALK betegner en alkylengruppe med 1-6 carbonatomer, og R^3 betegner hydrogen, halogen, hydroxy, en alkylgruppe med 1-4 carbonatomer eller en alkoxygruppe med 1-4 carbonatomer, eller L-Trp-OH, L-Phe-OH, L-Trp-Gly-OH eller L-Phe-Gly-OH, k e n d e t e g n e t ved, at man opbygger peptidkæden ved inden for peptidkemien sædvanligt
- 10 anvendte peptiddannende kondensationsreaktioner, om nødvendigt fjerner eventuelle beskyttelsesgrupper fra den dannede forbindelse, om ønsket oxiderer en dannet forbindelse, hvori A betyder H-(D- eller L-)Met eller desamino-Met, og om nødvendigt omdanner en dannet forbindelse til et funktionelt derivat som ovenfor
- 15 defineret.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at et dannet beskyttet peptid, hvori i det mindste aminosyre-resten Lys er beskyttet med en beskyttelsesgruppe, afbeskyttes,
- 20 hvorefter det opnåede peptid om nødvendigt oxideres og omdannes til det funktionelle derivat deraf.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at aminosyreresten NH-CHR-CO betegner Phé eller Ala.
- 25

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at A betegner L-Met, L-Met($\rightarrow$ O), L-Met(O_2), desamino-Met, desamino-Met(O) eller desamino-Met(O_2).

- 30 5. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at R^1 og R^2 begge er methyl.

Fremdragne publikationer: